

Trabajo de Fin de Grado

*Papel de FurC en la defensa de Anabaena
PCC7120 frente a estrés oxidativo*

*Role of FurC in Anabaena PCC7120 defence
against oxidative stress*

Autor

Guillermo Nevot

Directora

Emma Sevilla

Índice

Resumen	3
Abstract	3
1. Introducción	4
1.1. Las cianobacterias	4
1.2. El estrés oxidativo en cianobacterias	5
1.3. Principales sistemas de regulación del estrés oxidativo	5
1.3.1. SoxRS	5
1.3.2. OxyR	5
1.3.3. PerR	6
1.4. La familia de proteínas Fur	6
1.5. Las proteínas Fur de <i>Anabaena</i> PCC7120	7
1.5.1. FurA	7
1.5.2. FurB	8
1.5.3. FurC	9
2. Objetivos	10
3. Materiales y Métodos	10
3.1. Cepas y condiciones de cultivo utilizadas	10
3.2. Técnicas analíticas de proteínas	10
3.2.1. Determinación de proteínas totales	10
3.2.2. Determinación de la actividad catalasa	10
3.2.3. Determinación de la actividad superóxido dismutasa	11
3.2.4. Análisis de las isoformas de la superóxido dismutasa	12
3.3. Aislamiento y análisis de RNA por Real Time qRT-PCR	12
3.3.1. Aislamiento, extracción y cuantificación del RNA	12
3.3.2. Retrotranscripción	13
3.3.3. Real Time PCR	13
3.4. Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)	14
3.4.1. Amplificación de promotores por PCR	14
3.4.2. Preparación de los geles nativos de poliacrilamida	14
3.4.3. Electroforesis	14
3.5. Otras técnicas utilizadas	14
3.5.1. Determinación de la tasa fotosintética y respiratoria	14
3.5.2. Determinación de la tolerancia a estrés oxidativo	15

4.	Resultados	15
4.1.	La sobreexpresión de FurC disminuye la tolerancia de <i>Anabaena</i> PCC7120 a estrés oxidativo	15
4.2.	La sobreexpresión de FurC altera las tasas de respiración y fotosíntesis de <i>Anabaena</i> PCC7120	16
4.3.	El aumento de FurC disminuye las actividades catalasa y superóxido dismutasa de <i>Anabaena</i> PCC7120	17
4.4.	FurC tiene un papel relevante en la regulación transcripcional de la respuesta a estrés oxidativo en <i>Anabaena</i> PCC7120	18
4.4.1.	FurC regula de forma directa la expresión de <i>prxA</i> en respuesta a señales de estrés oxidativo	18
4.4.2.	FurC regula de manera indirecta la expresión de la catalasa <i>alr0998</i> en la respuesta a estrés oxidativo	19
4.4.3.	FurC regula la expresión de <i>sodA</i> en respuesta a señales de estrés oxidativo	20
4.5.	FurC regula la unión de FurB a promotores específicos de la respuesta a estrés oxidativo	21
5.	Discusión	22
5.1.	El aumento de FurC genera un fenotipo más sensible al estrés oxidativo	22
5.2.	FurC modula la transcripción de <i>prxA</i>	23
5.3.	FurC modula la actividad transcripcional de FurB	24
6.	Conclusiones	25
6.	Conclusions	25
7.	Bibliografía	26
	Material suplementario	28

Resumen

Las proteínas Fur son una familia de reguladores transcripcionales presente en un amplio rango de bacterias y cianobacterias. En la cianobacteria *Anabaena* PCC7120, se han identificado tres parálogos de esta familia denominados FurA, FurB y FurC. Mientras FurA y FurB tienen funciones bastante bien definidas, la función de FurC todavía se desconoce en detalle. Trabajos previos en nuestro laboratorio revelaron que FurC modulaba la autorregulación de FurA y FurB *in vitro*. Recientemente, la fuerte inducción de la expresión de FurC en condiciones de estrés oxidativo y su mecanismo de acción han llevado a proponerlo como el regulador de peróxido de hidrógeno (PerR) de *Anabaena* PCC7120. En el presente estudio, hemos analizado los efectos de la sobreexpresión de FurC en el fenotipo y el perfil transcripcional de *Anabaena* PCC7120 para aportar nueva información sobre la función FurC. En primer lugar se observó que los elevados niveles de FurC provocaban una mayor sensibilidad al estrés producido por peróxido de hidrógeno o metil viológeno. Ensayos bioquímicos adicionales revelaron una reducción de la actividad superóxido dismutasa y catalasa, entre otras alteraciones fisiológicas. Además, se determinó la expresión de genes clave en la respuesta a estrés. Nuestros datos revelaron una alteración del patrón de expresión en respuesta a estrés de los genes *sodA*, *alr0998* y *prxA*, sugiriendo que FurC era capaz de regularlos directa o indirectamente. Sin embargo, solo el promotor de *prxA* se describió como diana directa de FurC. Previamente se había descrito que FurB era capaz de unirse a los promotores de *sodA* y *alr0998*, regulando su transcripción. En este contexto, incubamos FurC y FurB conjuntamente en un ensayo EMSA cuyos resultados sugirieron una posible interacción entre estas dos proteínas que podría indicar una coordinación de la homeostasis del zinc y el estrés oxidativo.

Abstract

Fur proteins are a family of transcriptional regulators present in a broad range of bacteria and cyanobacteria. In the cyanobacteria *Anabaena* PCC7120, three paralogs of this family have been identified as FurA, FurB and FurC. Whereas FurA and FurB have well defined regulatory roles, the function of FurC remains unclear. Previous research in our group revealed that FurC modulates FurA and FurB autoregulation *in vitro*. Recently, the strong induction of FurC under oxidative stress conditions and its action mechanism has led to propose it as the hydrogen peroxide regulator (PerR) of *Anabaena* PCC7120. In the present study, we have analysed the effects of FurC-overexpression in the phenotype and transcriptional profile of *Anabaena* PCC7120 to provide further insights in FurC regulation. Firstly, the high levels of FurC led to more sensitivity to oxidative stress produced either by hydrogen peroxide or methyl viologen. Additional biochemical assays showed a reduction of superoxide dismutase and catalase activities among other physiological alterations. Furthermore, the expression of key genes involved in this response was determined. Our data revealed an impairment of the expression pattern under oxidative conditions in the genes *sodA*, *alr0998* and *prxA*, suggesting that FurC might directly or indirectly regulate them. Nevertheless, FurC only showed to bind directly to *prxA* promoter. Previously, it had been described that FurB protein was able to bind *alr0998* and *sodA* promoters, regulating their transcription. In this context, we incubated FurB and FurC together in an EMSA assay and its results suggested an possible interaction between the two proteins that could indicate a coordination of zinc homeostasis and oxidative stress.

1. Introducción

1.1. Las cianobacterias

Las cianobacterias constituyen un grupo de microorganismos Gram-negativos cuya aparición en la Tierra tuvo lugar aproximadamente hace 4.000 millones de años. Actualmente, se han descrito más de 2.600 especies (Nabout et al., 2013) y representan uno de los grupos procariotas con mayor diversidad morfológica.

Las cianobacterias son los únicos procariotas capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica. Utilizan un sistema muy similar al de los cloroplastos de plantas superiores, salvando ciertas diferencias. En cuanto a la disposición, los tilacoides se encuentran distribuidos por todo el citoplasma a diferencia de la disposición en grana de las células eucariotas. Por otro lado, utilizan otra serie de pigmentos fotosintéticos denominados ficobiliproteínas cuya agrupación en la superficie de la membrana tilacoidal forma los ficobilisomas. En la membrana, estos sistemas son capaces de captar la luz de 520-630 nm gracias a la unión de las ficobilinas, moléculas con estructura de tetrapirroles de cadena abierta. A través de este sistema, las cianobacterias son capaces de fijar el CO₂ en forma de azúcares utilizando el ciclo de Calvin y obtener así poder reductor (NADPH) durante la fase luminosa, liberando oxígeno a partir de agua en el proceso.

A pesar de constituir tan solo el 1% de la biomasa marina, las cianobacterias son las principales contribuyentes de la fijación de nitrógeno en los océanos. Principalmente, las cianobacterias son capaces de fijar este nitrógeno gracias a la formación de estructuras diferenciadas denominadas heterocistos y especializadas en esta función. Los heterocistos son células diferenciadas capaces de expresar el complejo nitrogenasa, responsable de la transformación del nitrógeno atmosférico en amonio asimilable. Además, debido a este fenómeno, las cianobacterias tienen una potencial aplicación como biofertilizantes.

La realización de estos procesos conlleva una regulación muy precisa. Gracias a la gran versatilidad y adaptabilidad de estos sistemas, las cianobacterias han sido capaces de colonizar prácticamente cualquier hábitat terrestre o acuático de la Tierra. En su origen, fueron responsables de la transformación de la atmósfera primitiva por liberación de altas cantidades de oxígeno durante el proceso conocido como la Gran Oxidación (GOE, Great Oxidation Event). Hoy en día, todavía representan un papel ecológico muy relevante. Por ejemplo, participando en la elevada cantidad de procesos biogeoquímicos de gran importancia ecológica como el ciclo del carbono o el nitrógeno.

No obstante, su crecimiento incontrolado bajo ciertas circunstancias (Por ejemplo alta concentración de N y P) da lugar a los denominados blooms, que generan problemas graves como la alteración de las aguas o la muerte de la microbiota y plantas acuáticas autóctonas, causando desequilibrios en los ecosistemas. Como agravante, algunas poblaciones de cianobacterias como *Microcystis aeruginosa* son capaces de producir cianotoxinas. La liberación de toxinas como la microcistina (principal toxina producida por el género *Microcystis*) genera grandes problemas sanitarios y ambientales ya que es hepatotóxica para animales y humanos.

Además de su importancia medioambiental, las cianobacterias han demostrado ser organismos productores de aminoácidos u otras moléculas con aplicaciones relevantes en la industria farmacéutica y alimentaria. Un ejemplo claro es la producción de espirulina, un suplemento alimenticio con alta proporción de proteína. Por estas y otras características, las cianobacterias se han convertido en un soporte atractivo para la biología sintética con el objetivo de optimizar la producción de biocombustibles o crear biosensores para un gran rango de estímulos ambientales, como la luz (Sengupta et al., 2018). Por estas razones, es clave entender la regulación fisiológica de las cianobacterias con el fin de avanzar en el conocimiento y desarrollo de los procesos donde las cianobacterias pueden presentar un papel importante.

1.2. El estrés oxidativo en cianobacterias

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son subproductos inevitables del metabolismo aeróbico. En el caso de organismos fotosintéticos oxigénicos como las cianobacterias, su producción está especialmente incrementada debido al transporte electrónico fotosintético. Fundamentalmente, la cantidad de ROS se ve aumentada bajo condiciones de alta intensidad de luz donde el transporte electrónico supera la tasa de consumo durante la fijación de CO₂ (Latifi et al., 2009).

Algunas de las ROS más importantes son el ion superóxido (O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (OH·) (Imlay, 2008; Latifi et al., 2009). Las tres especies presentan diferentes características y reactividades, por lo que muestran diferentes dianas y toxicidad. En organismos fotosintéticos, El O₂⁻ se produce principalmente en el PSI a través de la reacción de Mehler. El radical superóxido generalmente oxida los grupos sulfoferricos de las proteínas provocando la liberación de Fe⁺². Por otro lado, la principal fuente de H₂O₂ es la dismutación del O₂⁻, ya sea de forma espontánea o enzimática. El H₂O₂ es la especie menos reactiva, pero su reacción con el Fe⁺² a través de la reacción de Fenton la convierte en una fuente de radicales OH·. Además, el H₂O₂ también es capaz de oxidar los grupos tiol de las cisteínas. Por último, el radical OH· es altamente reactivo y es capaz de dañar directamente el DNA.

Las cianobacterias han desarrollado toda una serie de mecanismos en defensa contra el estrés oxidativo tanto por medio de compuestos como de enzimas antioxidantes (Latifi et al., 2009). Un ejemplo de los primeros son los carotenoides y sus derivados, pigmentos encargados de disipar el exceso de energía lumínica captada por los fotosistemas a través de mecanismos como el NPQ (Non Photochemical Quenching). En cuanto a las defensas enzimáticas, algunas de las más importantes en *Anabaena* PCC7120 son las superóxido dismutasas (SOD), las Mn-catalasas y las peroxirredoxinas.

Las SODs son capaces de dismutar el O₂⁻ en H₂O₂ y oxígeno. Aunque hay cuatro familias distintas según el metal cofactor, en *Anabaena* PCC7120 se han identificado únicamente una Mn-SOD (SodA) y una Fe-SOD (SodB) (Li et al., 2002). Por otro lado, las catalasas son enzimas que descomponen el H₂O₂ en oxígeno y agua. Principalmente, *Anabaena* PCC7120 presenta dos catalasas dependientes de manganeso, Alr0998 y Alr3090 (Banerjee et al., 2012). Finalmente, las peroxirredoxinas o alquilhidroperoxidasa reducen el H₂O₂ y otros peróxidos utilizando tioles como donadores de electrones. En el genoma de *Anabaena* PCC7120 se han encontrado siete genes codificando peroxirredoxinas como *alr4641* (*prxA*) (Banerjee et al., 2013; Cui et al., 2012).

1.3. Principales sistemas de regulación del estrés oxidativo

A lo largo de su evolución, las bacterias han desarrollado diferentes proteínas redox que perciben el incremento en la concentración de ROS y modulan la respuesta al estrés oxidativo principalmente a nivel transcripcional. Esencialmente, los sistemas más relevantes son SoxRS, OxyR y PerR (Latifi et al., 2009).

1.3.1. SoxRS

Los reguladores SoxR y SoxS median la respuesta al incremento de iones O₂⁻. En presencia de este ion o de óxido nítrico, el homodímero SoxR sufre la oxidación de sus centros sulfoferricos [2Fe-2S] e induce la transcripción de SoxS, que media la inducción de su regulón (Zheng and Storz, 2000). Entre los genes regulados por este sistema se encuentran la superóxido dismutasa SodA y la endonucleasa IV (*nfo*) cuyas actividades se relacionan con la defensa al estrés oxidativo (Zheng and Storz, 2000). Hasta la fecha no se han encontrado homólogos de este sistema en cianobacterias.

1.3.2. OxyR

OxyR percibe la presencia de H₂O₂ intracelular mediante la oxidación y formación de un puente disulfuro entre las cisteínas C199 y C208 (Mongkolsuk and Helmann, 2002). Esta proteína regula a enzimas muy relevantes en defensa contra el H₂O₂ como KatG o AhpCF (Latifi et al., 2009). Sin embargo, tampoco se han encontrado proteínas con función homóloga a OxyR en cianobacterias.

1.3.3. PerR

PerR es un regulador perteneciente a la familia de proteínas Fur que actúa como un represor sensible a peróxido identificado en muchas bacterias Gram-positivas como *Deinococcus radiodurans* o *Bacillus subtilis* y algunas Gram-negativas como *Neisseria gonorrhoeae*. A diferencia de SoxRS y OxyR, sí se han encontrado homólogos de PerR en cianobacterias. Concretamente, este regulador se ha identificado en *Synechocystis* PCC6803 (Li et al., 2004) y se ha propuesto el posible funcionamiento de FurC como PerR en *Anabaena* PCC7120 (Yingping et al., 2014). Debido a que el regulador PerR de *B. subtilis* es el primero descrito y uno de los mejor caracterizados (Ji et al., 2018; Lee and Helmann, 2006; Traoré et al., 2009), a continuación se explica en detalle su funcionamiento como modelo de esta familia de reguladores.

PerR de *B. subtilis* es una proteína de 145 aminoácidos de longitud que presenta una estructura tridimensional con un sitio de unión de un Zn^{+2} estructural y con otro sitio de regulación capaz de unir Fe^{+2} o Mn^{+2} , los cuales son iones relevantes para su función (Lee and Helmann, 2006). Los residuos que estarían implicados con la coordinación del metal regulador son H37, D85, H91, H93 y D104 (Ji et al., 2018; Traoré et al., 2009). Estudios de la estructura de rayos X de PerR han demostrado que la unión del metal regulador provocaría un cambio conformacional que permitiría la unión de PerR al DNA (Traoré et al., 2009).

A diferencia de OxyR, PerR no utiliza un sistema mediado por oxidación de cisteínas como mecanismo de regulación. Por el contrario, se ha demostrado que PerR percibe la presencia de H_2O_2 intracelular mediante una oxidación catalizada por metales (MCO) (Lee and Helmann, 2006). En dicho mecanismo, el H_2O_2 reaccionaría con el Fe^{+2} del sitio regulador oxidando en última instancia la proteína en la histidina 37 (H37) o en la H91, que incorporarían una molécula de oxígeno. La oxidación de uno de estos dos residuos sería responsable de la pérdida de afinidad por el metal regulador causando la incapacidad de PerR de unirse al DNA (Lee and Helmann, 2006; Traoré et al., 2009). Por consiguiente, la oxidación provocaría la pérdida de la actividad represora de PerR y promovería la expresión de una serie de genes involucrados en la defensa contra el estrés oxidativo incluidos dentro del regulón de PerR.

El regulón de PerR en *B. subtilis* incluye proteínas importantes en la defensa al estrés oxidativo generado por H_2O_2 (Chen et al., 1995; Fuangthong and Helmann, 2003). Las principales proteínas reguladas en este regulón y que son responsables de la reducción del H_2O_2 son la catalasa vegetativa KatA y el sistema alquilhidroperoxidasa AhpCF. Adicionalmente, en el regulón también se incluye la proteína MrgA, una proteína Dps capaz de unir al DNA y protegerlo del daño causado por el estrés oxidativo. Por otro lado, PerR se relaciona con la homeostasis del zinc por regulación directa de un transportador activo de este metal y con la homeostasis del manganeso puesto que se ha relacionado con MntR, el cual ha sido descrito como el factor de transcripción central del metabolismo del manganeso en *B. subtilis*.

Cabe destacar que las proteínas de la familia PerR descritas en distintos organismos promueven una serie de acciones similares para la defensa de la célula contra el estrés oxidativo. A pesar de coincidir de manera global en promover la expresión de proteínas antioxidantes y aumentar el cociente Mn:Fe intracelular, se debe tener en cuenta que la regulación transcripcional particular por la cual PerR realiza estas acciones es específica para cada organismo (Faulkner and Helmann, 2010).

1.4. La familia de proteínas Fur

Las proteínas Fur (Ferric uptake regulator) pertenecen a una familia de reguladores transcripcionales relacionados con la modulación del metabolismo de distintos metales en función de su disponibilidad, aunque posteriormente se han identificado miembros de esta familia con una gran diversidad de funciones. Esto ha dado lugar a subclasificaciones (Lee and Helmann, 2007). distinguiéndose entre ellas las proteínas relacionadas con la homeostasis del hierro (Fur), con la homeostasis del Zinc (Zur), con la homeostasis del manganeso (Mur) y con la respuesta a estrés oxidativo (PerR).

Las proteínas de esta familia comparten algunas características comunes como el tamaño reducido (entre 13 y 20 kDa), la presencia de un dominio N-terminal con un motivo genérico

de hélice-giro-hélice de unión al DNA y, por último, la presencia de un dominio C-terminal de dimerización donde se encuentra conservada una secuencia rica en histidinas ($H_2XHX_2CX_2C$). De forma general, las proteínas de esta familia pueden presentar dos o incluso tres sitios funcionales de unión a metales, aunque su papel biológico todavía es controvertido. Normalmente, estos sitios corresponden o bien a sitios con función estructural o bien a sitios de unión de un metal regulador a pesar de que se han encontrado variaciones entre proteínas Fur de distintos organismos (Fillat, 2014).

En cuanto a su mecanismo de regulación transcripcional, las proteínas Fur han sido descritas principalmente como represores. No obstante, en las proteínas Fur relacionadas con la homeostasis del hierro se han descrito una serie de mecanismos de mayor complejidad (Carpenter et al., 2009). El mecanismo de represión clásico de estas proteínas Fur sería el siguiente: altas concentraciones de Fe^{+2} intracelular favorecen la unión de este ion a la proteína y esta adquiere la capacidad de inhibir la transcripción de los genes de adquisición de hierro. Sin embargo, en algunos organismos como *H. pylori* se ha descrito el mecanismo contrario de represión para los genes relacionados con el almacenamiento de hierro. En este organismo, Fur ejerce de represor de estos genes en su forma apo, es decir, en su forma libre de Fe^{+2} . Por otro lado, Fur también ha sido descrito como activador directo (Delany et al., 2004) o indirecto a través de un RNA antisentido denominado RhyB en *E. coli* (Massé and Gottesman, 2002). Adicionalmente, se ha descrito en *Anabaena* PCC7120 que la unión del grupo hemo inhibe la unión del DNA de Fur (Hernández et al., 2004b)(Fig. 1)

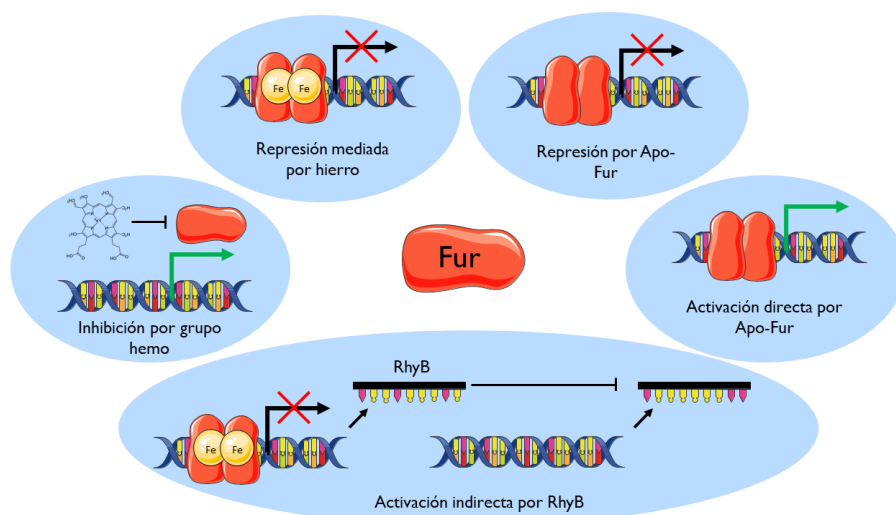


Figura 1. Representación esquemática de los diversos mecanismos conocidos que utilizan las proteínas Fur en varios organismos para regular los procesos donde intervienen.

1.5. Las proteínas Fur de *Anabaena* PCC7120

El análisis del genoma de *Anabaena* PCC7120 reveló la presencia de tres genes que contenían la secuencia consenso rica en histidinas característica de la familia Fur (Hernández et al., 2004a). Los productos de estos genes se denominaron FurA (Al11691), FurB (Al12473) y FurC (Alr0957).

1.5.1. FurA

FurA es la proteína que presenta mayor homología (40-45%) con las proteínas Fur de bacterias heterótrofas (González et al., 2010). La proteína consta de 151 aminoácidos y presenta un sitio de unión a Fe^{+2} con una función reguladora. Además, en condiciones estándar de cultivo, FurA es la más abundante de las tres proteínas Fur de *Anabaena* PCC7120 (López-Gomollón et al., 2009).

El estudio de FurA como regulador transcripcional ha demostrado que esta proteína interviene en los procesos de captación de hierro y su almacenamiento y en vías metabólicas relacionadas con la fotosíntesis y el nitrógeno. Además se ha descrito que la unión de esta proteína a sus promotores diana requiere condiciones reductoras y la presencia del hierro como metal represor (González et al., 2011). Por tanto, su actividad varía en función de la disponibilidad de Fe^{+2} y el estado redox de la célula. Recientemente, ensayos *in vitro* han mostrado que FurA

presenta actividad disulfuro reductasa por lo que podría tener un papel aún por determinar en la homeostasis redox (Botello-Morte et al., 2015, 2013).

En cuanto a su propia regulación, FurA se controla a distintos niveles. A nivel transcripcional, se regula a si misma por unión a su propio promotor (Hernández et al., 2004a), además otros reguladores transcripcionales como el regulador global de la asimilación de nitrógeno NtcA (Kaushik et al., 2017) así como su parálogo FurB parecen regular su expresión (Hernández et al., 2004a). A nivel postranscripcional, sus niveles se regulan por acción del RNA antisentido *alr1690- α -furA* (Sevilla et al., 2011). Por otro lado, se ha propuesto un mecanismo de regulación a nivel postraduccional en el que la unión del grupo hemo a un motivo CP provocaría la inactivación de FurA (Hernández et al., 2004b).

1.5.2. FurB

FurB fue identificada en nuestro laboratorio como una proteína de 132 aminoácidos y 15 kDa de peso molecular. En su secuencia se encontraron cinco residuos de cisteína, al igual que FurA, y siete histidinas. El punto isoeléctrico predicho para esta proteína fue de 8,7, más alto que el de sus homólogos FurA y FurC. En una primera caracterización, ensayos EMSA de nuestro laboratorio demostraron que FurB era capaz de unirse a los promotores de los tres homólogos Fur, incluyendo su propio promotor. Además, se observó que esta unión era potenciada por la presencia de FurA e inhibida por la presencia de FurC. A su vez, la presencia de FurB también era capaz de potenciar la unión de FurA a dichos promotores. Sin embargo, no se confirmó la posibilidad de que este efecto fuera debido a la formación de heterodímeros (Hernández et al., 2004a).

Estudios posteriores de nuestro grupo revelaron una posible función de FurB como proteína de defensa frente al estrés oxidativo en *Anabaena* PCC7120 (López-Gomollón et al., 2009). En dichas condiciones, se vio que FurB aumentaba su expresión de forma significativa. La alta concentración de la proteína y su alto pI llevaron a proponer que FurB era capaz de unir inespecíficamente al DNA y protegerlo del daño oxidativo. En efecto, un ensayo de protección *in vitro* demostró que FurB evitaba la degradación del DNA en presencia de DNasa I o radicales hidroxilo. Por otro lado, la sobreexpresión de FurB en *E. coli* aumentó su supervivencia al estrés, reforzando la hipótesis del papel protector de esta proteína. De esta manera, se propuso un papel dual para FurB: a bajas concentraciones, FurB presentaría una función de regulador transcripcional de genes específicos mientras que, a altas concentraciones generadas por el estrés, esta proteína sería capaz de unirse inespecíficamente al DNA y protegerlo (López-Gomollón et al., 2009). Adicionalmente, se observó que la unión del grupo hemo a FurB, probablemente a través del motivo CPV, provocaba la inhibición de su unión al DNA (López-Gomollón et al., 2009).

Más adelante, se identificó la función de FurB a bajas concentraciones como regulador transcripcional de la homeostasis del zinc (Napolitano et al., 2012). En este estudio se describió que FurB regulaba la expresión de toda una serie de proteínas relacionados con la regulación del zinc en *Anabaena* PCC7120 como metalochaperonas putativas (All4722, All1751), parálogos de metaloproteínas de zinc (All4725/HemE, All4723/ThrS) y transportadores ABC (ZnuABC). FurB fue capaz de unirse al promotor de estos genes de manera específica mediante un mecanismo dependiente de Zn^{+2} . La hipótesis contemplaba que, en presencia de este metal, el ion se uniría al sitio regulador y permitiría la unión dimérica de FurB a estas secuencias, donde ejercería su acción como represor.

El avance del estudio de FurB/Zur en nuestro laboratorio permitió caracterizar con más detalle el papel de esta proteína en el estrés oxidativo de *Anabaena* PCC7120. Mediante comparación de una cepa de delección y una cepa de sobreexpresión de *furB*, se consiguieron identificar una serie de genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo que estaban directamente regulados por FurB. En concreto, se observó que FurB era capaz de unir específicamente a los promotores de *sodA* (Mn-SOD), *alr0998* (Mn-Catalasa) y *prxA* (peroxirredoxina) y, con una unión más débil, a *alr3090* (Mn-Catalasa) y *gct3* (peroxirredoxina). La falta de FurB resultó en una menor resistencia al estrés oxidativo generado por H_2O_2 y su sobreexpresión dio como resultado un fenotipo más resistente al estrés. Curiosamente, el mutante carente de *furB*

presentó mayor actividad catalasa y SOD a pesar de dar lugar a un fenotipo menos resistente al estrés oxidativo (Sein-Echaluze et al., 2015), sugiriendo que la función de FurB podría tener implicaciones adicionales más complejas.

Recientemente, se ha publicado un artículo en el cual se relaciona la estructura tridimensional de FurB con algunas de sus funciones previamente descritas. A partir de la estructura ya resuelta de FurB de *M. tuberculosis* (Lucarelli et al., 2007), se realizó un modelo tridimensional de la estructura de FurB de *Anabaena* PCC7120. Según este modelo, podía apreciarse la cercanía de 4 Cys (C81, C84, C121 y C124) estructuradas en dos motivos CXXC y un último residuo de Cys (C93) alejado al inicio de la cuarta alfa hélice. Mediante ensayos de tinción específica de zinc, se determinó que FurB sería capaz de unir un ion de Zn^{+2} con papel estructural a través de las cuatro Cys más próximas. La Cys más alejada (C93) estaría involucrada en la unión de un segundo Zn^{+2} relevante para su función como regulador de zinc y la percepción del estado redox intracelular (Sein-Echaluze et al., 2018).

1.5.3. FurC

De los tres parálogos de Fur en *Anabaena* PCC7120, FurC es el que más diferencia presenta en su secuencia de DNA y de proteína. En concreto, FurC solo presenta el 18% de homología con FurA (Hernández et al., 2004a). Aunque FurC conserva un dominio de histidinas, este difiere en gran medida del característico observado para el resto de las proteínas de la familia Fur. Además a diferencia de FurA y FurB, no se ha descrito que FurC sea capaz de unir el grupo hemo puesto que carece de los motivos CP o CPV responsables de la unión (López-Gomollón et al., 2009).

Los primeros estudios que se llevaron a cabo con esta proteína revelaron que FurC no era capaz de unirse ni a su propio promotor ni al de sus dos parálogos (FurA y FurB) en ensayos de retardo en gel. No obstante, la incubación conjunta de FurC con las otras dos proteínas sugirió una posible modulación de la capacidad de unión de FurA y FurB a sus propios promotores, aumentando la afinidad de FurA y disminuyendo la de FurB como ya se ha mencionado anteriormente (Hernández et al., 2004a).

Posteriormente, FurC ha sido propuesto como el regulador de respuesta a peróxido de hidrógeno (PerR) de la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 (Yingping et al., 2014). Diversas razones han llevado a proponer a FurC como este regulador. El primer indicio a favor de esta hipótesis fue el aumento de la expresión de FurC en condiciones de estrés generado por peróxido de hidrógeno. Ensayos de tipo EMSA posteriores parecieron demostrar que, al igual que su homólogo en *B. subtilis*, FurC sería capaz de percibir la concentración de peróxido de hidrógeno intracelular gracias a una oxidación catalizada por metales (MCO). Esta oxidación sería un mecanismo regulador de la capacidad de unión de FurC con el DNA, siendo capaz de unirse a sus promotores específicos solo en estado reducido y en presencia de Mn^{+2} . A su vez, FurC resultó ser capaz de unir específicamente dos promotores cuya expresión aumentaba significativamente en estrés por peróxido de hidrógeno, una peroxirredoxina (*prxA*) y una sulforredoxina (*srxA*), encargada de la regeneración de la anterior. Por estas razones, FurC podría funcionar como coordinador de la respuesta a peróxido de hidrógeno por un mecanismo similar a los reguladores de la familia PerR.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo consiste en aportar nueva información sobre la función fisiológica de FurC en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo de *Anabaena* PCC7120. Con el fin de lograrlo, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la tolerancia al estrés oxidativo de la cepa EB2770 de sobreexpresión de FurC.
2. Determinar los valores de las tasas fotosintética y respiratoria de la cepa EB2770.
3. Cuantificar las actividades catalasa y superóxido dismutasa, las cuales son relevantes en la defensa contra el estrés oxidativo, en la cepa EB2770.
4. Analizar la expresión de genes clave para la defensa contra el estrés oxidativo en condiciones de exposición a agentes oxidantes tanto en la cepa EB2770 como en la cepa *wild-type*.
5. Estudiar la unión *in vitro* de FurC a distintos promotores de genes involucrados en la regulación del estrés oxidativo.

3. Materiales y Métodos

3.1. Cepas y condiciones de cultivo utilizadas

En este trabajo se utilizaron dos cepas de *Anabaena*, la cepa PCC7120, *wild-type*, y la cepa EB2770, de sobreexpresión de FurC. La cepa EB2770 había sido generada previamente en el laboratorio (Broset, 2012).

Todas las cepas fueron cultivadas a 25-30°C en medio líquido BG-11 y bajo iluminación de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Adicionalmente, los cultivos fueron o bien agitados con incubador orbital a 180 rpm o bien con un burbujeo constante de aire. Los cultivos a pequeña escala se realizaron en un matraz de Erlenmeyer de 250 mL de capacidad y los cultivos a gran escala se realizaron en un matraz de Roux de 1L de capacidad.

La preparación del medio BG-11, cuya composición se describe en (Rippka, 1988) (Tabla 1, Material Suplementario), se realizó mediante la preparación de 1L de medio basal y la adición proporcional (1 mL) de suplemento con los oligoelementos requeridos por las cianobacterias (Tabla 2, Material suplementario). Posteriormente, se autoclavó la disolución resultante. Cuando fue necesario, se añadió al medio la cantidad adecuada del antibiótico Neomicina 50 $\mu\text{g/ml}$ para mantener el plásmido en la cepa EB2770.

3.2. Técnicas analíticas de proteínas

3.2.1. Determinación de proteínas totales

Se recogieron 15 mL de cultivo en fase exponencial y se centrifugaron 10 min a 4000 rpm. Entonces, se descartó el sobrenadante suavemente por decantación y se resuspendió el pellet en 1 mL de tampón fosfato para su posterior sonicación en intervalos de 45" (Amplitud 0.8 y ciclo 0.5) con pausas de 30" tras cada intervalo. El extracto crudo obtenido se centrifugó 5 min a 12000 rpm y el sobrenadante se utilizó tanto para la cuantificación de proteína como para la determinación de actividades enzimáticas. La determinación de proteínas totales se realizó mediante el método del ácido bicinonínico mediante el BCATM Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.2. Determinación de la actividad catalasa

El protocolo utilizado para la determinación de la actividad catalasa fue una modificación de protocolos previamente publicados. (Beers and Sizer, 1952; González et al., 2010). El procedimiento para obtener el extracto proteico y su cuantificación se realizó como se describe en el apartado 2.2.1 de este trabajo. El extracto se resuspendió en 1 mL de tampón fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 50 mM pH 7.

Una vez cuantificada la cantidad de proteína en el extracto, se tomó el volumen correspondiente a 350 µg de proteína y se introdujeron en una cubeta de cuarzo, a la cual se añade H₂O₂ hasta alcanzar la concentración final de 20 mM. Rápidamente, se midió la absorbancia de la mezcla a intervalos de 1 segundo durante 5 minutos con un espectrofotómetro (Specord® 250 Plus). Como blanco se empleó la misma cantidad de extracto proteico, completando con idéntico volumen de agua destilada en vez de H₂O₂. La actividad de la catalasa se calculó entonces como:

$$\text{Actividad específica } \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right) = \frac{\frac{\Delta \text{Abs}_{240}}{\text{min}} * 1000}{43.6 * \frac{\text{mg proteínas}}{\text{ml reacción}}}$$

Donde 1U se define como la cantidad de enzima que cataliza la descomposición de 1 µmol de H₂O₂ por minuto. Las mediciones se realizaron por triplicado para cada cepa.

3.2.3. Determinación de la actividad superóxido dismutasa

La actividad superóxido dismutasa (SOD) se determinó siguiendo el protocolo descrito en trabajos previos (González et al., 2010; Lai et al., 2008; Winterbourn et al., 1975). El procedimiento para obtener el extracto proteico y su cuantificación se realizó como se describe en el apartado 2.2.1 de este trabajo. El extracto se resuspendió en 1 mL de tampón fosfato (KH₂PO₄/K₂HPO₄) 67 mM pH 7,8.

Para la monitorización de la absorbancia se mezclaron directamente en cubetas espectrofotométricas las cantidades de reactivos especificadas en la Tabla 1. La riboflavina y TEMED fueron añadidos en último lugar. Al control se añadió la cantidad equivalente de tampón. Acto seguido, se midió la absorbancia de todas las cubetas. Después, se iluminaron las cubetas (a excepción del blanco) con luz UV durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se midió de nuevo la absorbancia de todas las muestras. Con los datos obtenidos, se calculó la $\Delta \text{Abs}_{560}/\text{min}$ en el control negativo, fijándolo como la variación máxima, puesto que carece de SOD, y el de las muestras. El porcentaje de inhibición se calculó como:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\left(\frac{\Delta \text{Abs}_{560}}{\text{min}} \right)_{\text{Control negativo}} - \left(\frac{\Delta \text{Abs}_{560}}{\text{min}} \right)_{\text{muestra}}}{\left(\frac{\Delta \text{Abs}_{560}}{\text{min}} \right)_{\text{Control negativo}}} * 100$$

Puesto que 1U enzimática se define como la cantidad de enzima que provoca una inhibición del 50% y dividiendo entre la cantidad de proteína del extracto en la mezcla, obtenemos la actividad específica:

$$\text{Actividad específica } \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right) = \frac{\% \text{ de inhibición}}{50 * 0,6 \text{ mg de proteína}}$$

Tabla 1. Composición del contenido de las cubetas para analizar la actividad SOD

Cubetas	Blanco (x2)	C. negativo (x2)	Muestra
Extracto proteico (µg)	-	-	600µg
Tampón fosfato 67mM pH7,8 (µL)	900 (+ 23,6)	900	Completar hasta 1mL
EDTA 100 mM (Conc. final 6,4 mM) (µL)	65	65	65
NBT 1,2mM (Conc. Final 41µM) (µL)	35	35	35
Riboflavina 0,12 mM (Conc. Final 2,3µM) (µL)	-	20	20
TEMED ≈9,9% (Conc. Final 23,5 µM) (µL)	-	3,6	3,6

3.2.4. Análisis de las isoformas de la superóxido dismutasa

El protocolo de visualización de las formas de la SOD en gel fue adaptado de estudios anteriores (Yingping et al., 2014). Se tomaron 15 mL de cultivo de los cuales se obtuvo el extracto proteico resuspendido en tampón fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 67 mM pH 7,8 por sonicación y centrifugación. Tras la cuantificación por el método de BCA, se aplicó en un gel nativo de 10% de acrilamida (La composición definida se especifica en la Tabla 3, Material suplementario) el volumen correspondiente a 30 μg de proteína junto con 3 μL de tampón de carga (50 mM Tris-HCl pH8, 30% (v/v) de glicerol y azul de bromofenol 0.25% (m/v)) y se realizó una electroforesis a 90 V durante 2h. Una vez terminada, los geles fueron incubados para su revelado en oscuridad y agitación con una disolución de 25 mL de NBT 2,5 mM durante 30 min seguida la incubación con una disolución de TEMED 28 μM y 28 μM de Riboflavina durante 20 min. La tinción fue completada mediante la exposición de los geles a la luz del ambiente.

3.3. Aislamiento y análisis de RNA por Real Time qRT-PCR

3.3.1. Aislamiento, extracción y cuantificación del RNA

Para la extracción, se recogieron 25 mL de cultivo en condiciones control y en estrés oxidativo (250 μM de agua oxigenada o 5 μM de metil viológeno) a diferentes tiempos (1h, 6h y 24h) de las cepas de *Anabaena* PCC7120 y EB2770. Las células fueron recogidas mediante centrifugación 5 min a 4000 rpm y 4°C. El sobrenadante fue decantado suavemente y las células fueron resuspendidas en el medio restante y transferidas a un eppendorf libre de RNasas de 2 mL. Después, se volvieron a centrifugar las muestras 5 min a 14.000 rpm y cuatro grados, retirando esta vez el sobrenadante con una pipeta.

Los pellets fueron resuspendidos en 600 μL de tampón de resuspensión (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA pH 8) y 200 μL de cloroformo. Los tubos fueron invertidos cuatro veces para asegurar la resuspensión de las muestras y se dejaron reposar en hielo 3 min. Acto seguido, se centrifugó 5 min a 14.000 rpm y 4°C. De las tres fases obtenidas, se eliminó cuidadosamente con pipeta la fase superior acuosa y la fase inferior orgánica para recolectar la fase intermedia correspondiente a las células. Una vez aisladas, las células fueron sumergidas en N_2 líquido para su almacenamiento a -80°C.

Las muestras obtenidas fueron descongeladas y resuspendidas en 300 μL de tampón de resuspensión, 100 μL de 250 μM EDTA disódico pH 8, 400 μL de tampón de lisis (2% SDS, 10 mM de acetato sódico pH 4.5) y 1000 μL de fenol ácido a 65°C. Las muestras fueron agitadas mediante vórtex durante 30 s e incubadas en un baño de 65°C durante 2,5 min hasta un total de 3 veces. Después, se centrifugó 5 min a 14000 rpm y 4°C y la fase acuosa superior se transfirió a un nuevo eppendorf. Entonces, se añadió 1 mL de trizol, se agitó en vortex durante 30 s y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Una vez completado este tiempo, se añadieron 200 μL de cloroformo seguido de vórtex durante 30 s e incubación a temperatura ambiente durante 1 min. La mezcla obtenida se centrifugó durante 5 min a 14000 rpm y 4°C y 750 μL de la fase acuosa resultante fueron transferidos a un nuevo tubo eppendorf. Una vez finalizado este paso, se añadieron 750 μL de cloroformo seguido de agitación durante 30 s en vórtex y centrifugación 5 min a 14000 rpm para retirar el sobrenadante a un nuevo eppendorf. Este paso se realizó dos veces. Finalmente, a la mezcla final se añadieron 1,5 mL de etanol absoluto a 4°C. Tras agitar 30 s en vórtex, se guardaron las muestras a -80°C O/N para precipitar el RNA.

Al día siguiente, las muestras fueron descongeladas y centrifugadas durante 30 min a 14.000 rpm y 4°C. El sobrenadante resultante fue eliminado cuidadosamente con pipeta y el precipitado fue lavado, sin resuspender, con 500 μL de etanol 70% a 4°C. Acto seguido, se centrifugaron las muestras 5 min a 14.000 rpm y 4°C y el sobrenadante acuoso fue retirado. Para asegurar la eliminación del etanol, se dejaron los tubos durante 1h abiertos para favorecer la evaporación. El precipitado fue resuspendido en 90 μL de agua libre de RNasas. Para eliminar los restos de DNA de la muestra, se añadieron 10 μL de tampón de DNasa y 2 μL de enzima DNasa (Sigma-Aldrich®). La mezcla se incubó durante 70 min a 37°C y 10 min a 65°C para inactivar la enzima. Este tratamiento fue realizado dos veces. Finalmente, el resultado fue cuantificado

en un espectrofotómetro (Specord® 250 Plus) midiendo la Abs_{260nm} y aplicando la siguiente igualdad: $1 Abs_{260nm} = 40 \mu g/mL$ de RNA.

La integridad de las muestras de RNA se analizó cargando 3 μl de las muestras en un gel de agarosa 1% en tampón TBE (90 mM Tris/HCl pH 8, 90 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA) teñidos con 0,5 $\mu g/mL$ de bromuro de etidio durante 30 min a 90 V.

Para comprobar la ausencia de DNA en las muestras, se utilizó la técnica de Real Time qRT-PCR para amplificar el gen housekeeping *rnpB*. Se tomaron 10 μl de una dilución 200 veces menos concentrada de las muestras para el análisis. Esta concentración es similar a la del ensayo posterior, comprobándose así la ausencia de interferencias por amplificación de DNA genómico contaminante en las muestras.

3.3.2. Retrotranscripción

Para la retrotranscripción, se tomó el volumen correspondiente a 2 μg de RNA de cada muestra y se mezclaron con los random primers en tampón de hibridación (Tabla 4, material suplementario). Dicha mezcla se incubó 10 min a 85°C (desnaturalización) y 1h a 50°C (hibridación de los oligonucleótidos). Tras este tiempo, se añadieron 20 μl de la segunda mezcla con los reactivos necesarios (Tabla 4, material suplementario) y la enzima retrotranscriptasa. La disolución resultante se incubó 1h a 48°C y 15 min a 75°C. La retrotranscriptasa utilizada para este ensayo corresponde a la SuperScript™ II Reverse Transcriptase (ThermoFisher®).

3.3.3. Real Time PCR

Para la cuantificación relativa de la expresión se utilizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (Real Time PCR). La reacción de Real Time PCR se llevó a cabo en el sistema ViiA™ Real-Time PCR (Applied Biosystems®) utilizando el colorante SYBER® Green.

El gen housekeeping *rnpB* se usó como referencia para la cuantificación relativa de los transcritos de cDNA de los genes seleccionados. Los genes a analizar fueron amplificados utilizando los oligonucleótidos indicados en la tabla 5 del Material Suplementario. Dichos oligonucleótidos fueron diseñados usando el software Primer Express® v3.0.1 (Applied Biosystems). Para cada nucleótido, se realizó una recta de calibrado con el objetivo de calibrar la concentración de muestra necesaria para que el resultado de la amplificación se situara en el rango de sensibilidad de la técnica.

Las reacciones se realizaron en placa de 96 pocillos con un volumen final de 30 μl , conteniendo 20 μl de mezcla de reacción y 10 μl de muestra. La mezcla de reacción fue preparada tal y como se indica en la tabla 6 del Material Suplementario. Las muestras iniciales (2 μg) fueron diluidas 50 partes previamente a su adición a los pocillos.

Todas las reacciones se prepararon con tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Los valores fueron normalizados con respecto a los valores obtenidos para el gen *rnpB* mediante el método de Ct comparativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method) (Pfaffl, 2001). El valor Ct corresponde al número de ciclos de PCR que ha requerido la muestra para ser detectada. Por tanto, correlaciona con la cantidad de DNA presente en la muestra. Primero se calcula la diferencia entre los valores Ct (ΔCt) para cada muestra experimental como los valores obtenidos para el gen de interés menos los obtenidos para el gen housekeeping. Entonces, se calcula la diferencia entre las ΔCt ($\Delta\Delta Ct$) de las muestras para la condición problema y las muestras para la condición control. El número de veces de variación relativa de la expresión (*fold-change*) se calcula entonces como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para comprobar que realmente la diferencia de expresión en respuesta a estrés oxidativo para las dos cepas era estadísticamente significativa se aplicó el test t. Adicionalmente, solo se consideraron como cambios significativos aquellos superiores a $\pm 1,5$ veces.

3.4. Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

3.4.1. Amplificación de promotores por PCR

Los promotores utilizados para los ensayos EMSA fueron amplificados usando la técnica de PCR. La amplificación correspondiente a cada promotor se realizó utilizando los oligonucleótidos recogidos en la Tabla 5 del Material Suplementario (Invitrogen, Biomers). Se empleó la Taq polimerasa (BioTools®) adecuando las mezclas de reacción a las instrucciones del fabricante.

La amplificación se comprobó mediante separación a 90 V durante 20 minutos en geles de agarosa al 1% en tampón TBE (90mM Tris/HCl pH 8, 90 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA) teñidos con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Para la limpieza y purificación de los productos de la amplificación se utilizó el GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (SigmaAldrich®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.2. Preparación de los geles nativos de poliacrilamida

Los geles nativos utilizados fueron preparados a una concentración del 6% de poliacrilamida. La composición de la mezcla de polimerización se especifica en la Tabla 7 del Material Suplementario. Los geles fueron precorridos a 60 V durante al menos dos horas a 4°C en tampón de electroforesis (glicina 380mM y 50mM Tris-HCl pH 8) después de limpiar adecuadamente los pocillos manualmente.

3.4.3. Electroforesis

Las mezclas de incubación se realizaron con 50 ng de los promotores de interés mezclados con tampón de unión con una concentración final de 500 nM de proteína. El tampón de unión se compone de 10 mM Bis-Tris pH 7.5, 40 mM KCl, 5% (v/v) glicerol y 0.05 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma®). A las mezclas también se añadió el agente reductor DTT para imitar las condiciones reductoras de la célula y los cofactores iónicos adecuados cuando fueron necesarios (MnCl₂, ZnSO₄). Las mezclas fueron incubadas 30 minutos a temperatura ambiente. Todas las muestras incorporaron el fragmento de DNA inespecífico de la secuencia codificante del gen *alr2502*. Como control negativo, se incubó una muestra en ausencia de proteína.

Después de la incubación y una limpieza de los pocillos, las muestras se mezclaron con 3 µl de tampón de carga (50 mM Tris-HCl pH8, 30% (v/v) de glicerol y azul de bromofenol 0.25% (m/v)) y fueron cargadas lentamente en el gel. La electroforesis se realizó a 90 V y 4°C durante 1h y 45 minutos. Los geles se revelaron mediante tinción con 5 µl de 1 µg/ml de SYBR® Safe (Invitrogen) durante 30 minutos a temperatura ambiente, oscuridad y agitación suave. Las bandas se visualizaron en el equipo BioRad Gel Doc 2000.

3.5. Otras técnicas utilizadas

3.5.1. Determinación de la tasa fotosintética y respiratoria

La determinación de la tasa fotosintética neta (balance de oxígeno generado por la fotosíntesis real menos el consumido por la fotorrespiración y la respiración oxidativa) y la tasa respiratoria de las dos cepas utilizadas en este trabajo se llevó a cabo mediante la medida de la producción y desaparición de oxígeno a lo largo del tiempo con un electrodo tipo Clark. Este electrodo utiliza un cátodo de platino y un ánodo de plata.

El dispositivo empleado fue OXYL1 (Hansatech®) que contiene el electrodo dentro de una cámara de reacción termostatzada. El manejo de los datos se realizó con el software O₂ View proporcionado por el mismo fabricante. Para el montaje del electrodo, se depositaron unas gotas de la disolución de puente salino (KCl 2M) sobre el cátodo y el ánodo y se recubrió con una lámina de papel y una membrana PTFE de teflón permeable a oxígeno. Todo ello se fijó con aros de goma. Para comprobar la fiabilidad del montaje, se confirmó la aparición de un voltaje inicial de 4095 mV que decrece hasta estabilizarse en 1800-2100 mV.

La calibración del electrodo consta de dos partes: la calibración de la luz y la calibración de la medida de oxígeno. La calibración de la luz se realizó siguiendo las indicaciones del software

aportando los datos suministrados por un fotosensor. Para la calibración de la medida, se fijaron como concentración máxima de oxígeno una disolución de agua destilada agitada durante más de 30 minutos y como concentración mínima una disolución de ditionito de sodio, que reacciona consumiendo el oxígeno ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaHSO}_4 + \text{NaHSO}_3$). Ambas disoluciones se introdujeron en el electrodo y se siguieron paso a paso las instrucciones del software hasta finalizar la calibración.

Las medidas fueron realizadas introduciendo en la cámara 1 mL de cultivo a 25°C de temperatura y agitación del 65%, asegurando una dilución homogénea sin alterar la integridad de la membrana. Para las medidas de la tasa fotosintética, se iluminó a una intensidad $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ cubriendo completamente la cámara con papel de aluminio, minimizando la entrada de luz externa.

3.5.2. Determinación de la tolerancia a estrés oxidativo

Con el objetivo de analizar la supervivencia de las cepas *Anabaena* PCC7120 y EB2770 bajo el efecto del estrés oxidativo, se preparó una placa de 96 pocillos con 200 μl de cultivo en fase exponencial de ambas cepas con diferentes concentraciones de agua oxigenada (H_2O_2) (0, 0.5, 1, 3, 7 y 10 mM) y metil viológeno (1, 2.5, 5, 7.5 y 10 mM). Las placas fueron preparadas en esterilidad, cubiertas con parafilm para evitar la evaporación y con papel de aluminio para evitar el efecto de la luz del ambiente. Dichas placas se mantuvieron en agitación a 90 rpm y a temperatura ambiente. La cuantificación de la supervivencia se realizó midiendo la $\text{Abs}_{650\text{nm}}$ con un espectrofotómetro adaptado para placas de 96 pocillos (Multiskan EX ThermoFisher) tras la previa resuspensión de los cultivos.

4. Resultados

4.1. La sobreexpresión de FurC disminuye la tolerancia de *Anabaena* PCC7120 a estrés oxidativo

Con el objetivo de comparar la tolerancia al estrés oxidativo de las cepas de *Anabaena* PCC7120 y la cepa de sobreexpresión de FurC EB2770, se incubaron ambas estirpes en una placa de 96 pocillos con diferentes concentraciones de agentes inductores de estrés oxidativo como son el peróxido de hidrógeno y el metil viológeno (Fig. 2).

Como se observa en ambos casos, los resultados muestran claramente una menor tolerancia de la cepa EB2770 ante el estrés generado por ambos compuestos. En concreto, se estudió la tolerancia a las concentraciones de 0, 0.5, 1, 3, 7 y 10 mM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). A la concentración de 3 mM de H_2O_2 la cepa EBB2770 experimenta una menor supervivencia a las 48h de exposición mientras que la cepa control PCC7120 no experimenta una afectación similar hasta concentraciones superiores de 7 mM de H_2O_2 . Respecto a la tolerancia al metil viológeno (MV), se ensayaron los cultivos a las concentraciones de 0, 1, 2.5, 5, 7.5 y 10 μM . En este rango, la cepa PCC7120 parece ser tolerante tras 96h de exposición mientras que la cepa EB2770 experimenta una afectación cada vez mayor conforme aumenta la concentración (Fig. 2).

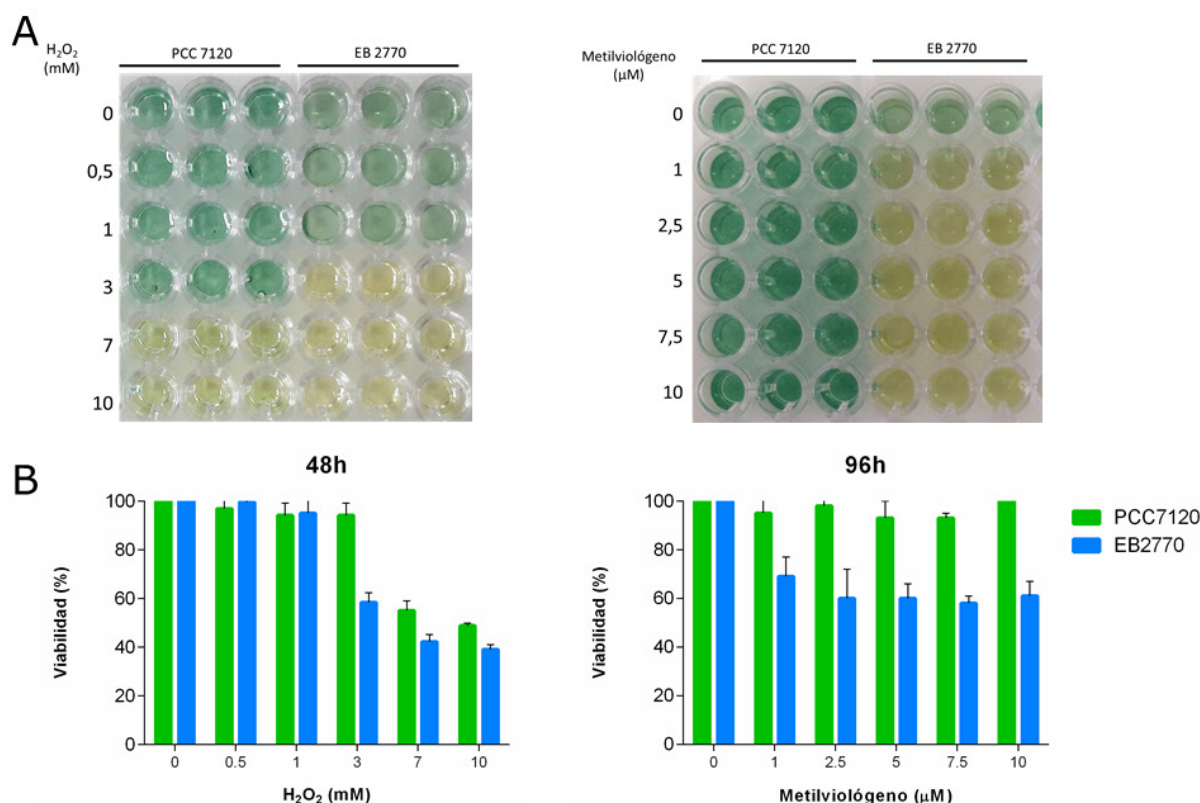


Figura 2. Tolerancia de las cepas PCC7120 (verde) y EB2770 (azul) a estrés oxidativo. **(A)** Placas de tolerancia a estrés oxidativo frente a 48h de exposición a H₂O₂ (izq.) y frente a 96h de MV. (dcha.). **(B)** Porcentaje de viabilidad de los cultivos en H₂O₂ (izq.) y MV (dcha.) calculada a partir de las medidas de absorbancia para cada concentración de agente oxidativo y normalizadas respecto del cultivo control en ausencia de agentes oxidantes.

4.2. La sobreexpresión de FurC altera las tasas de respiración y fotosíntesis de *Anabaena* PCC7120

Para profundizar en el conocimiento del estado fisiológico de ambas cepas, se determinó la tasa respiratoria y la tasa fotosintética neta mediante la medición de la variación de oxígeno con un oxímetro. Los cultivos utilizados se encontraban en crecimiento exponencial ($D.O_{750nm} \approx 0,4$) y los datos fueron normalizados respecto a millón de células tras realizar el conteo con una cámara de Neubauer. Los valores para ambas tasas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Tasas de respiración y fotosíntesis de las cepas PCC7120 y EB2770. Los valores se expresan como variación de nmol de oxígeno por segundo y millón de células.

Cepa de <i>Anabaena</i> sp.	Fotosíntesis neta (nmol _{o₂} s ⁻¹ 10 ⁻⁶ cél. ⁻¹)	Respiración (nmol _{o₂} s ⁻¹ 10 ⁻⁶ cél. ⁻¹)
PCC7120	0,34 ± 0,05	0,016 ± 0,004
EB2770	0,12 ± 0,04	0,032 ± 0,002

La tasa fotosintética neta se define como el balance entre el oxígeno generado por la fotosíntesis menos el consumido por la respiración oxidativa y la fotorrespiración. En el caso de la cepa de sobreexpresión de EB2770, la fotosíntesis neta es aproximadamente un tercio de la observada para la cepa PCC7120. El descenso de la fotosíntesis respecto a la cepa control podría estar relacionado con una disminución en la concentración de los pigmentos fotosintéticos del ficobilisoma. Estudios previos de nuestro laboratorio indicaron que en la cepa de sobreexpresión de FurC existía un descenso de la expresión de estos pigmentos. Por lo tanto, sería lógico pensar que las células de la cepa EB2770 que presentan un menor contenido de ficobiliproteínas muestren una tasa fotosintética neta reducida.

Por el contrario, la cepa EB2770 presenta aproximadamente el doble de respiración que la cepa PCC7120. El aumento de la respiración podría deberse a un efecto compensatorio para conseguir energía en forma de ATP. Debido a que la fotosíntesis se encuentra disminuida, la célula se podría ver obligada a utilizar otras vías como la respiración para suplir esa falta de energía.

4.3. El aumento de FurC disminuye las actividades catalasa y superóxido dismutasa de *Anabaena* PCC7120

Las actividades catalasa y superóxido dismutasa (SOD) están estrechamente relacionadas con la defensa de las ROS en estrés oxidativo. Con motivo de estudiar la menor tolerancia de la cepa EB2770, se determinaron ambas actividades en el extracto proteico de las cepas EB2770 y *wild-type* para explorar posibles diferencias. En efecto, el resultado obtenido que se muestra en la Figura 3 indicó que la cepa EB2770 presentaba una menor actividad tanto superóxido dismutasa como catalasa. La actividad SOD por célula medida para la cepa EB2770 fue aproximadamente un 40% de la observada para la cepa control PCC7120. A su vez, también la actividad catalasa de dicha cepa se encontraba reducida a la mitad en comparación con el control. La disminución de las dos actividades tan importantes en la defensa contra el estrés oxidativo en la cepa de sobreexpresión EB2770 parece ser coherente con la menor tolerancia de dicha cepa al estrés oxidativo.

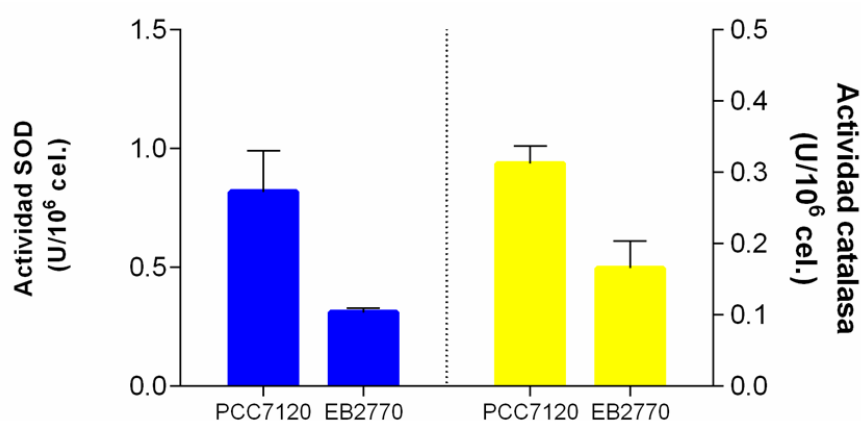


Figura 3. Representación de la actividad SOD (azul) y catalasa (amarillo) medida por millón de células para cada cepa. La cantidad de células fue cuantificada mediante cámara de Neubauer antes de la extracción proteica.

Anabaena PCC7120 presenta dos isoformas de la proteína SOD: SodA o Mn-SOD y SodB o Fe-SOD (Li et al., 2002). Por tanto, la disminución observada de la actividad SOD podía estar causada por una alteración de una o ambas isoformas. Para averiguarlo, se realizó el análisis de las dos isoformas de la SOD mediante separación en gel nativo de poliacrilamida y tinción específica de actividad SOD. El resultado reveló que una de las isoformas (SodA) está ausente en la cepa de sobreexpresión (Fig.4).

La isoforma ausente en EB 2770 corresponde con SodA (*all0070*). El papel de ambas isoformas de la SOD en *Anabaena* PCC 7120 permanece en estudio, aunque parece ser que SodB aumenta en las condiciones de falta de nitrógeno y diferenciación a heterocisto mientras que la expresión de SodA correlaciona con un aumento en las condiciones de estrés oxidativo inducidas por metil viológeno (Li et al., 2002).

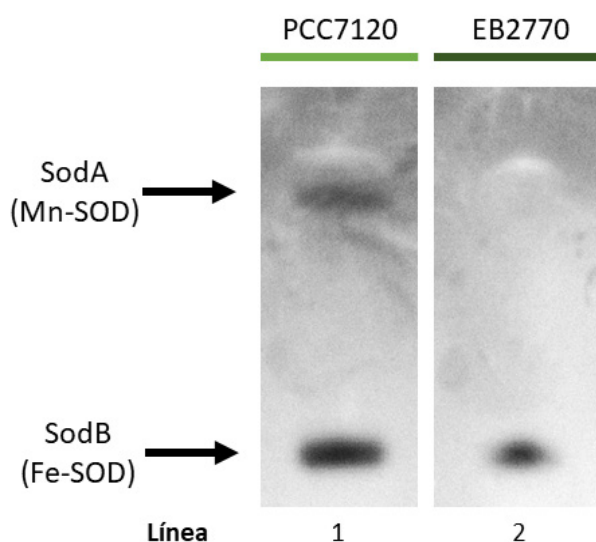


Figura 4. Gel de tinción específica de la actividad SOD en condiciones normales. Con flechas se indican las bandas correspondientes a las dos isoformas de la SOD. En la cepa EB2770 no se pueden apreciar las bandas correspondientes la isoforma SodA.

La falta de Mn-SOD en la cepa de sobreexpresión podría ser una causa de su menor supervivencia a estrés oxidativo, sobre todo teniendo en cuenta que la isoforma SodA ausente tiene un papel más relacionado con el estrés oxidativo que SodB.

4.4. FurC tiene un papel relevante en la regulación transcripcional de la respuesta a estrés oxidativo en *Anabaena* PCC7120

Para conocer *in vivo* la función de FurC como regulador transcripcional, se aplicó la técnica de Real Time qRT-PCR para conocer los patrones de expresión de ciertos genes. Los genes escogidos fueron *prxA* (*alr4641*), puesto que su promotor había sido previamente descrito como diana directa de FurC (Yingping et al., 2014), *sodA* (*all0070*) y *alr0998*, cuyas respectivas actividades superóxido dismutasa y catalasa estaban alteradas en el mutante de sobreexpresión. Adicionalmente, los productos de estos tres genes están relacionados con la defensa al estrés oxidativo. La expresión de estos genes se determinó tanto en la cepa EB2770 como en la cepa PCC7120, en condiciones normales y en condiciones de estrés oxidativo con H₂O₂ (250 µM) o con MV (5 µM). Fueron considerados como cambios significativos aquellos en los que el gen presentó una variación de al menos $\pm 1,5$ veces en la expresión.

4.4.1. FurC regula de forma directa la expresión de *prxA* en respuesta a señales de estrés oxidativo

Estudios previos determinaron que FurC es capaz de unirse directamente al promotor del gen *prxA* (Yingping et al., 2014), por lo que esta proteína parecía ser una diana directa de FurC. En estudios previos en nuestro laboratorio, se analizó la expresión de *prxA* en condiciones normales observándose diferencias de expresión entre la cepa control PCC7120 y la cepa de sobreexpresión. La repetición de esta medición confirmó que la cepa EB2770 presentaba aproximadamente tres veces menos expresión de *prxA* en condiciones normales (Fig. 5A). En base a estas observaciones, se puede afirmar que la sobreexpresión de FurC afecta a la expresión de *prxA*.

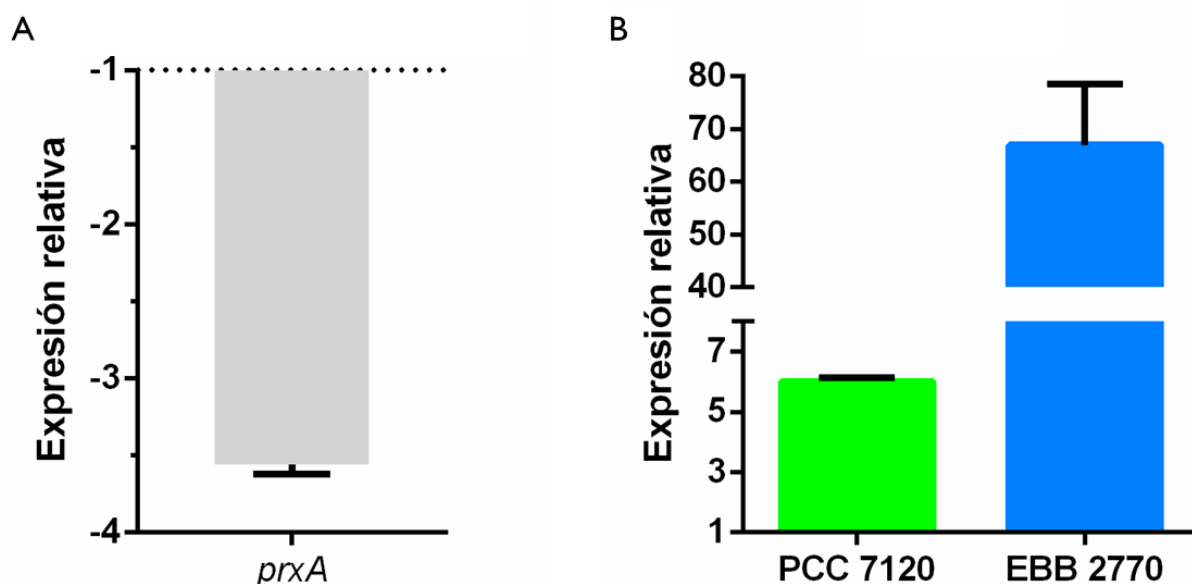


Figura 5. Expresión diferencial del gen *prxA* en las cepas PCC7120 y EB2770. (A) Expresión diferencial de *prxA* en EB2770 frente a PCC7120 en condiciones normales. (B) Variación en la expresión de *prxA* en respuesta al estrés oxidativo tras 1h de exposición a H₂O₂.

En este trabajo, se estudio además el efecto de la presencia de agentes causantes del estrés oxidativo sobre la regulación transcripcional de este gen. El análisis en condiciones de estrés oxidativo tras 1h de exposición a H₂O₂ reveló una inducción de la expresión de *prxA* tanto en la cepa *wild-type* como en la cepa de sobreexpresión de FurC. Mientras en la cepa PCC7120 la expresión de este gen aumentó aproximadamente 3 veces, las mismas condiciones provocaron

un aumento de la expresión de aproximadamente 60 veces en la cepa EB2770 (Fig. 5B). En cualquier caso, la diferencia encontrada en el patrón de transcripción observado en la expresión de *prxA* frente al observado en condiciones de estrés oxidativo indica que FurC regula de manera directa la expresión del gen *prxA* y que esta respuesta está modulada por la señal de estrés oxidativo.

4.4.2. FurC regula de manera indirecta la expresión de la catalasa *alr0998* en la respuesta a estrés oxidativo

En estudios previos de nuestro laboratorio, se determinó que FurC no era capaz de unir de forma específica el promotor del gen *alr0998* el cual codifica para una Mn-Catalasa. Sin embargo, la reducción de la actividad catalasa y la menor tolerancia al estrés oxidativo en la cepa EB2770 sugerían que su expresión podría estar alterada por la sobreexpresión de FurC. De este modo, para comprobarlo se procedió a analizar la expresión de este gen en condiciones normales y en estrés oxidativo.

El análisis de la expresión de *alr0998* realizado previamente en nuestro laboratorio reveló que tanto la cepa *wild-type* como la cepa de sobreexpresión de FurC presentaban los mismo niveles de expresión de este gen en condiciones normales. La repetición de esta medida reveló resultados similares, confirmando que no había cambio en la expresión (Datos no mostrados). En conclusión, el aumento de FurC no supuso una alteración de la expresión del gen *alr0998* en condiciones normales.

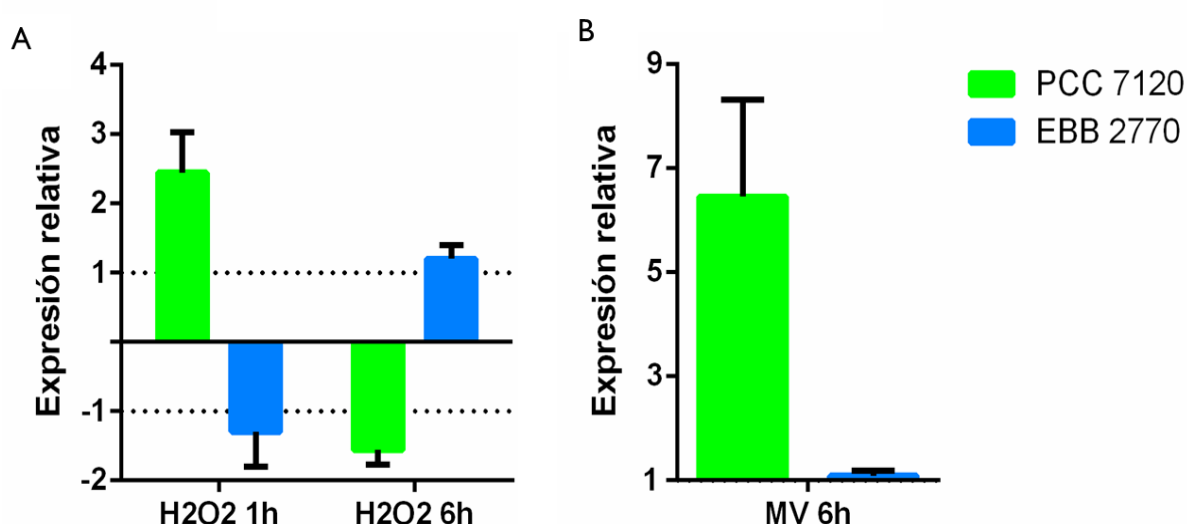


Figura 6. Expresión diferencial del gen *alr0998* en las cepas PCC7120 y EB2770. Representación de la expresión del gen *alr0998* en condiciones de estrés oxidativo generado (A) por H₂O₂ (1h y 6h) y (B) por MV (6h). Los cambios se representan para la cepa EB2770 (azul) y PCC7120 (verde).

Sin embargo como se observa en la Figura 6, el análisis de la expresión en condiciones de estrés oxidativo sí reveló diferencias entre las dos cepas. La expresión del gen *alr0998* aumentó alrededor de 2 veces en la cepa control PCC7120 en muestras de cultivos expuestos durante 1h a 250 μ M de H₂O₂. Esto no ocurrió en la cepa EB2770 sometida a las mismas condiciones donde la expresión de *alr0998* prácticamente no varió (Fig. 6A). Este mismo comportamiento se pudo observar de manera más marcada cuando el estrés fue generado por 6h de exposición a MV (Fig. 6B). La cepa control PCC7120 aumentó cerca de 7 veces su expresión en estas condiciones mientras que la cepa de sobreexpresión EB2770 no presentó ninguna variación en la expresión de *alr0998*. Sin embargo, los niveles de expresión medidos para muestras expuestas durante 6h a H₂O₂ apenas experimentaron diferencia lo que podría indicar que la respuesta a estrés oxidativo había tenido lugar a tiempos más tempranos y, a ese tiempo, ya no se observó respuesta (Fig. 6A).

En conjunto, estas observaciones parecen indicar que la sobreexpresión de FurC afecta a la expresión de *alr0998* en condiciones de estrés oxidativo mientras que este efecto no ocurre en condiciones normales.

4.4.3. FurC regula la expresión de *sodA* en respuesta a señales de estrés oxidativo

Ensayos previos de nuestro laboratorio determinaron que FurC tampoco era capaz de unir de forma directa al promotor del gen *sodA*. A pesar de este hecho y de manera análoga a *alr0998*, las alteraciones fenotípicas de la menor tolerancia al estrés oxidativo y la reducción de la actividad SOD de la cepa EB2770 sugerían una alteración de su expresión. Además, la tinción de actividad SOD de las dos isoformas tras su separación en un gel reveló la falta de esta isoforma, reforzando la hipótesis de que su expresión podría estar alterada. Con objetivo de comprobarlo, también se analizó la expresión del gen *sodA* en ambas cepas en condiciones normales y de estrés oxidativo.

Al igual que con *alr0998*, el análisis de la expresión de *sodA* en condiciones normales reveló que no había diferencias de expresión entre las dos cepas (Datos no mostrados). Por tanto, la sobreexpresión de FurC tampoco parecía en principio afectar la expresión de este gen en condiciones normales.

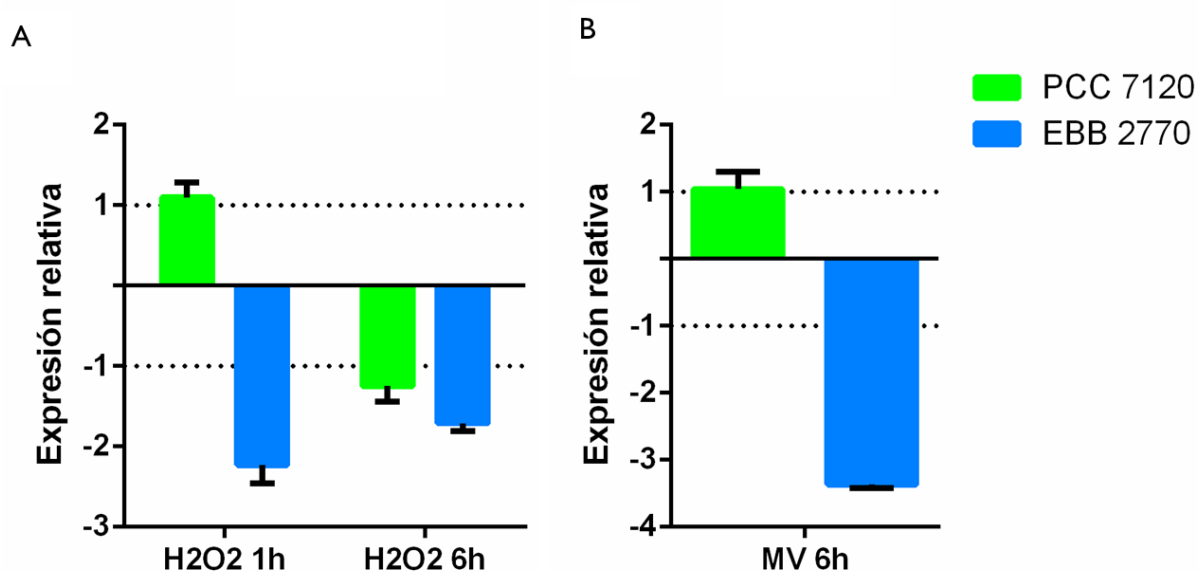


Figura 7. Expresión diferencial de *sodA* en las cepas PCC7120 y EB2770. Representación de la expresión del gen *sodA* en condiciones de estrés oxidativo generado (A) por H₂O₂ (1h y 6h) a la izquierda y (B) por MV (6h) a la derecha. Los cambios se representan para la cepa EB2770 (azul) y PCC7120 (verde).

Por el contrario, el patrón de expresión de *sodA* en condiciones de estrés oxidativo se encuentra alterado (Fig. 7). En concreto, en estrés generado por 1h de exposición a H₂O₂ la cepa control PCC7120 mantiene los mismos niveles de expresión mientras que la cepa de sobreexpresión EB2770 presenta una reducción de dos veces la expresión con respecto a la situación sin estrés. El mismo efecto se puede apreciar en el estrés generado por exposición a 6h de MV, la cepa control mantiene su expresión pero en la cepa EB2770 la expresión se reduce aproximadamente 3 veces (Fig. 7A). Por tanto, ocurre un efecto similar al observado con *alr0998* en el que se observa un fenotipo reprimido de la respuesta a estrés oxidativo en la cepa de sobreexpresión. En la respuesta a estrés generada por H₂O₂ tras 6h de exposición sigue sin alterar la expresión del gen *sodA* en la cepa PCC7120 y la cepa EB2770 sigue presentando una expresión reducida (Fig 7B).

En base a estos resultados, parece ser que FurC también regularía indirectamente el gen *sodA* y que esa regulación dependería de si la célula se encuentra en situación de estrés oxidativo o no.

4.5. FurC regula la unión de FurB a promotores específicos de la respuesta a estrés oxidativo

Debido a que tanto la actividad como la expresión de las enzimas antioxidantes de *Alr0998* y *SodA* se encontraron alteradas en el mutante en condiciones de estrés oxidativo, la sobreexpresión de *FurC* parecía estar afectando a la regulación de transcripcional de sus genes correspondientes. Puesto que *FurC* pertenece a una conocida familia de reguladores transcripcionales, las proteínas *Fur*, cabía la posibilidad de que *FurC* estuviera ejerciendo su efecto por unión directa con sus promotores. Sin embargo, previamente en nuestro laboratorio se describió que *FurC* no era capaz de unir estos promotores mediante ensayos EMSA. En los resultados mostrados en las líneas 6 y 7 de la Figura 8 se puede observar el mismo fenómeno, a pesar de que la *FurC* demostró estar activa al observarse la formación de un complejo con el promotor de *prxA* (Línea 9, Fig. 8) con quien sí se había descrito anteriormente una unión directa (Yingping et al., 2014). Por tanto, estas estos ensayos sugieren que *FurC* no regula directamente estos genes por unión específica con su promotor.

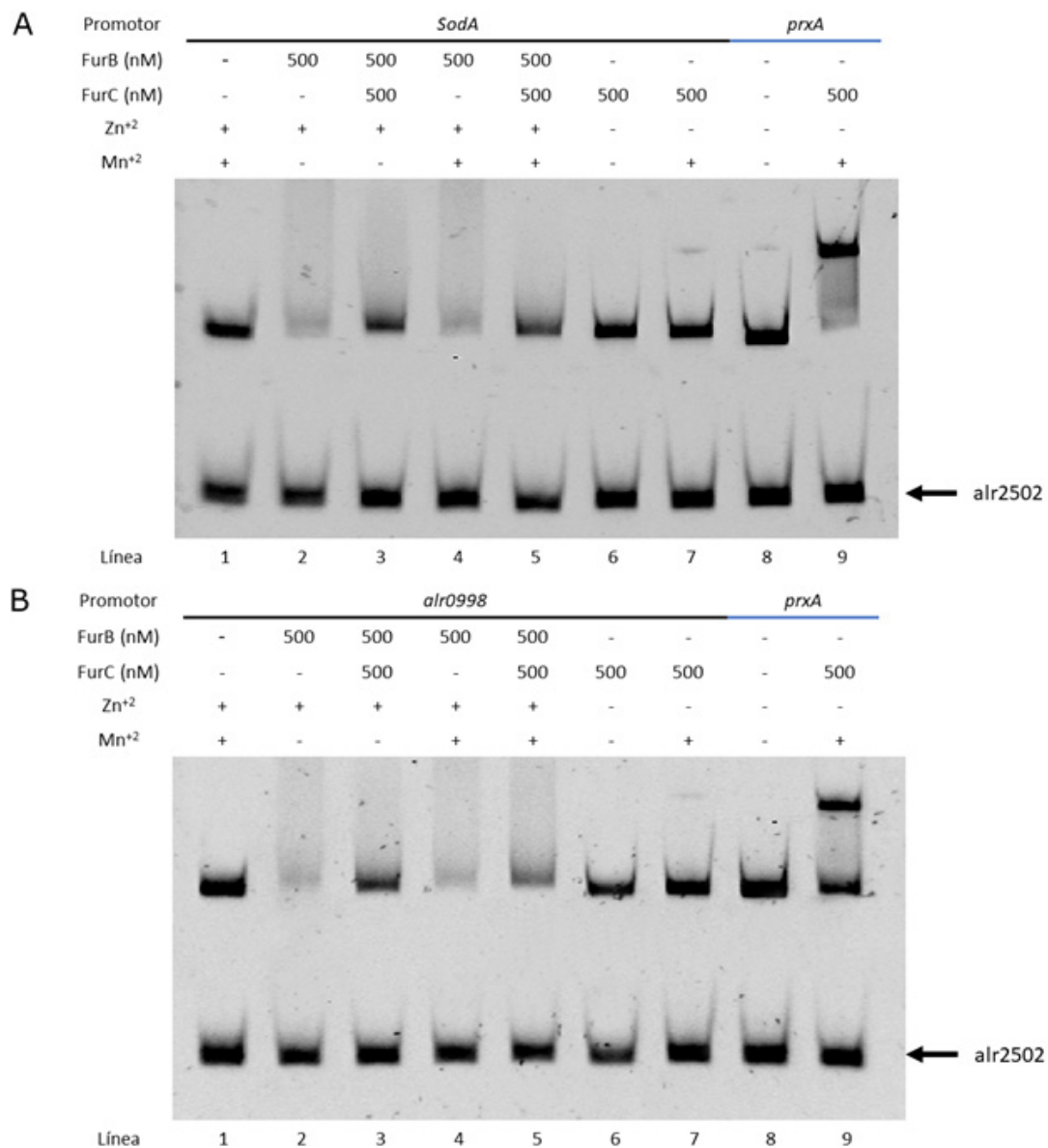


Figura 8. Interacción de *FurC* con los promotores de *sodA* (A) y *alr0998* (B). En ambos casos se observa unión específica de *FurB* con ambos promotores (líneas 2 y 4) mientras que la presencia de *furC* inhibe la unión tanto con Mn²⁺ (línea 5) como sin él (línea 3). *FurC* no es capaz de unir ninguno de los promotores (líneas 6 y 7) directamente a pesar de que sí es capaz de unir específicamente al promotor de *prxA* (línea 9). Para la correcta función de *FurB*, se añadió el ión Zn²⁺ en los casos necesarios (Líneas 1-5).

Sin embargo, en trabajos anteriores del grupo se había descrito la capacidad de FurC de regular indirectamente la unión de FurB con los tres promotores de los homólogos Fur de *Anabaena* PCC7120 (Hernández et al., 2004a). Adicionalmente, se había observado que FurB era capaz de unir específicamente los promotores de los genes *sodA* y *alr0998* (Sein-Echaluze et al., 2015). A la vista de estos antecedentes, parecía plausible la hipótesis de que el mecanismo por el cual FurC inhibe la unión de FurB con los promotores fur también afectara a la unión de FurB a los promotores de *sodA* y *alr0998*. De esta manera, FurC sería capaz de regular indirectamente la expresión de estas proteínas como se había observado.

Para comprobar dicha hipótesis, se realizaron ensayos EMSA incubando ambas proteínas, FurC y FurB, junto con los promotores de *sodA* y *alr0998* con una concentración de proteína final de 500 nM. Dado que FurB requiere la presencia de Zn^{+2} para el correcto funcionamiento de su actividad (Napolitano et al., 2012), este se añadió en los casos que fue necesario. Los resultados que se muestran líneas 3 y 5 de la Figura 8 revelan una disminución de la capacidad de FurB *in vitro* de unirse a los promotores tanto de *sodA* (Fig. 8A) como de *alr0998* (Fig. 8B) en presencia de FurC. La incubación de FurB en ausencia de FurC dio como resultado la unión específica a ambos promotores, comprobándose que FurB estaba activa (Líneas 2 y 5, Fig. 8). Por tanto, cabe la posibilidad de que FurC regule la transcripción de *sodA* y *alr0998* de manera indirecta a través de la modulación de FurB. Además, se observó que FurC era capaz de realizar este efecto tanto en presencia como en ausencia de Mn^{+2} .

5. Discusión

Como se ha mencionado en la introducción, FurC es una de las tres proteínas Fur de *Anabaena* PCC7120. De ellas, FurC es la que menos homología presenta con sus parálogos (Hernández et al., 2004a) y también es la menos caracterizada en cuanto a función. Recientemente, se ha propuesto a FurC como el regulador PerR de *Anabaena* PCC7120 (Yingping et al., 2014). La principal razón que apoya esta hipótesis es que FurC sería capaz de percibir el H_2O_2 intracelular mediante una oxidación catalizada por metales (Yingping et al., 2014), al igual que se ha descrito para otras PerR como en el caso de *B. subtilis* (Lee and Helmann, 2006). Además, el hecho de que FurC aumenta en condiciones de estrés generado por H_2O_2 y la descripción de que se une específicamente a los promotores de genes relevantes para la defensa contra el estrés oxidativo como *prxA* refuerzan la hipótesis de que FurC podría ser el regulador de la respuesta a peróxido de hidrógeno en *Anabaena* PCC7120.

El alineamiento de FurC con las secuencias de PerR descritas para *B. subtilis*, *D. radiodurans*, *S. pyogenes* y *Synechocystis* PCC6803 parece sugerir que se conservan algunos residuos que han sido relacionados con la unión al metal regulador (Fig. 1, Material suplementario). En detalle, estos residuos corresponderían a los descritos como H37, H91, H93 y D104, todos ellos supuestamente implicados con la unión del Mn^{+2} o el Fe^{+2} en la proteína PerR de *B. subtilis* (Ji et al., 2018; Lee and Helmann, 2006; Traoré et al., 2009). Por consiguiente, estos residuos serían susceptibles de cumplir un papel similar en FurC, sugiriendo que ambas proteínas podrían compartir un mecanismo de acción similar.

En este trabajo se propuso profundizar en el estudio de la función de FurC en estrés oxidativo mediante la caracterización del fenotipo y el perfil transcripcional en condiciones de este estrés de una cepa de sobreexpresión previamente generada en nuestro laboratorio (Broset, 2012).

5.1. El aumento de FurC genera un fenotipo más sensible al estrés oxidativo

El estudio de la tolerancia al estrés oxidativo de la cepa de sobreexpresión EB2770 y la cepa control PCC7120 reveló que la primera era mucho más sensible a dicho estrés que la segunda. Esto se comprobó tanto en estrés generado por H_2O_2 como por MV. Además, en otro estudio anterior se observó que la sobreexpresión de FurC provocó la completa inhibición del crecimiento en condiciones de exposición a H_2O_2 (Yingping et al., 2014), lo que es coincidente con los resultados de este trabajo.

El análisis posterior de la cepa de sobreexpresión reveló datos congruentes con esta observación. En primer lugar, las actividades catalasa y SOD globales de la cepa EB2770 se encontraron disminuidas. Además, de las dos enzimas SOD descritas para *Anabaena* PCC7120 se encontró que la isoforma SodA se encontraba ausente en condiciones de sobreexpresión de FurC. Previamente se había descrito que un aumento de la expresión de esta isoforma promueve una mayor resistencia a estrés oxidativo (Li et al., 2002) por lo que su ausencia sería coherente con la menor resistencia de la cepa EB2770. En condiciones de estrés oxidativo, tanto *sodA* como *alr0998* no experimentaron en la cepa EB2770 el patrón de expresión de respuesta a estrés observado en la cepa control. Dicho de otra manera, los datos parecían apuntar a que la sobreexpresión de FurC impidió la respuesta al estrés oxidativo de estas dos enzimas.

Sin embargo, los datos de expresión medidos en condiciones normales para los genes *sodA* y *alr0998* eran similares a los de la cepa control. Esto contrastaba con la medición de las actividades catalasa y SOD globales, que también habían sido realizadas en condiciones normales. Una explicación plausible de este hecho es que FurC podría estar actuando como “buffer de iones” secuestrando el manganeso, tal y como se ha propuesto que podría ocurrir con el hierro en cepas de sobreexpresión de FurA (González et al., 2010). Previamente, se había descrito que FurC era capaz de unir Mn^{+2} (Yingping et al., 2014). En base a esta hipótesis, el exceso de FurC secuestraría el Mn^{+2} intracelular e impediría la acción de la Mn-SOD codificada en *sodA* y la Mn-Catalasa codificada en *alr0998*, ambas dependientes de la unión con este ion para formar su estructura funcional (Banerjee et al., 2012; Li et al., 2002). Esto daría como resultado la reducción de ambas actividades catalíticas cuando FurC está sobreexpresada, tal y como se ha observado. Al margen de la hipótesis anterior, también hay otras dos explicaciones posibles de este fenómeno si se considera la causa de esta expresión para cada gen por separado.

En el caso de *sodA*, mediciones anteriores realizadas en nuestro laboratorio tras 48h de cultivo registraron una expresión reducida de EB2770 en comparación con la cepa control, por lo que este dato sí sería coincidente con la actividad SOD reducida observada. En este trabajo, la determinación de la expresión de la cepa control se realizó tras 1h de cultivo en medio recién añadido mientras que la determinación de la actividad enzimática se realizó a $D.O_{760nm} \approx 0.4$ tras varios días del crecimiento. Por tanto, cabe la posibilidad de que en condiciones iniciales de cultivo, cuando los nutrientes y otros factores son abundantes, la expresión de *sodA* no decayera en un cultivo sin exposición a agentes oxidantes. En cambio, ciertos cambios generados por el crecimiento en la cepa EB2770 conllevarían que *sodA* redujera su expresión y, en consecuencia, la observación de una actividad SOD menor en dicha cepa.

Por otro lado en el caso del gen *alr0998*, podría estar ocurriendo que el descenso de la actividad catalasa global en condiciones normales no fuera debido a la menor expresión de la Mn-catalasa codificada en *alr0998* sino a que otra de las múltiples proteínas con actividad catalasa en el genoma de *Anabaena* PCC7120 (Banerjee et al., 2013) estuviera reprimida en condiciones estándar. Esto daría lugar al fenómeno observado de menor actividad catalasa global observado en la cepa EB2770.

Finalmente, la menor resistencia a estrés oxidativo de la cepa EB2770 también podría deberse a que el gen *prxA* presenta una expresión reducida. Si bien es cierto que su expresión aumenta en condiciones de estrés generado por 1h H_2O_2 , esta expresión podría no ser suficiente para compensar la pérdida de actividad SOD y catalasa mencionadas anteriormente.

Por otra parte, cabe destacar que la fotosíntesis también se encontró alterada en la cepa de sobreexpresión de FurC. Esto sugiere que FurC puede intervenir en otros procesos fisiológicos además de la respuesta a estrés oxidativo. Esto es congruente con el hecho de que no se haya conseguido obtener un mutante de delección para FurC en *Anabaena* PCC7120 (Yingping et al., 2014). Además, esta función adicional podría no estar presente en las proteínas PerR de otros organismos ya sean heterótrofos (Faulkner and Helmann, 2010) o autótrofos como *Synechocystis* PCC6803 (Li et al., 2004) donde sí se han obtenido mutantes de delección.

5.2. FurC modula la transcripción de *prxA*

En un intento por explicar la función de FurC en estrés oxidativo, los datos obtenidos nos han llevado a sugerir una hipótesis de regulación diferente en función de si FurC se une específicamente al promotor del gen regulado, como ocurre con *prxA*, o por el contrario no es capaz de dicha unión, como ocurre con *sodA* y *alr0998*.

En el primer caso, las medidas de *prxA* en la cepa EB2770 sugirieron que FurC funcionaría como represor. En condiciones normales, FurC se encontraría unido al DNA e inhibiría la expresión de *prxA*. Este comportamiento sería coherente con que la expresión de *prxA* en condiciones normales fue más baja para la cepa de sobreexpresión de FurC que en la cepa control PCC7120. A mayor concentración de FurC, aumentaría la unión de esta proteína a los promotores de este gen y reprimiría con mayor intensidad la expresión de *prxA*. Una vez en condiciones de estrés oxidativo, FurC sería capaz de percibir el estado redox de la célula a través de un mecanismo todavía por determinar que provocaría su liberación del DNA. De hecho, esto sería congruente con el comportamiento observado para ambas cepas tras exposición de 1h a H₂O₂. Además, esta hipótesis también explicaría el aumento drástico de la expresión observado para la cepa EB2770. La expresión de EB2770 es una medida relativa que compara la expresión en condiciones de estrés oxidativo en comparación con los valores obtenidos para condiciones normales. Al partir de una expresión más reprimida debido a la alta concentración de FurC, su inactivación provocaría un aumento considerable de la expresión con respecto a su estado anterior, dando lugar al incremento elevado observado. En la cepa control PCC7120 este aumento fue menor en términos relativos porque partía de un estado normal con una expresión basal mayor y, en consecuencia, el aumento de la expresión debido al estrés no fue tan marcado.

Una posible explicación de este mecanismo podría ser que FurC actúa de manera similar a PerR por medio de una oxidación catalizada por metales (MCO). De hecho, ambas proteínas han demostrado tener residuos conservados que intervienen en este sistema, entre los que se encuentran dos histidinas (H37 y H91) cuya oxidación da lugar a la liberación de PerR del DNA en *B. subtilis* (Duarte and Latour, 2010; Lee and Helmann, 2006; Traoré et al., 2009). En esta hipótesis, FurC sería capaz de percibir el H₂O₂ intracelular por una oxidación que provocaría su liberación del DNA y la expresión de genes de defensa, como se ha observado en el caso de *prxA*. En esta línea, futuros estudios con extractos de FurC con diversos grados de oxidación podrían ser útiles para determinar la validez de este mecanismo.

5.3. FurC modula la actividad transcripcional de FurB

En cuanto a los genes *sodA* y *alr0998*, en teoría la sobreexpresión de FurC no debería modificar su expresión ya que, como previamente se demostró en nuestro laboratorio, FurC no es capaz de unir específicamente ninguno de los dos promotores. Sin embargo, sus patrones de expresión en respuesta a estrés resultaron estar alterados en la cepa EB2770 por lo que la mayor concentración de FurC podría estar afectando a su regulación de algún modo indirecto. Por tanto, era necesario estudiar cómo FurC era capaz de influir en la expresión de estos genes.

Previamente en nuestro laboratorio, se describió que el parólogo FurB era capaz de unir específicamente los promotores de estos dos genes (Sein-Echaluze et al., 2015). Además, otros estudios de nuestro grupo habían descrito que FurC era capaz de inhibir la unión de FurB *in vitro* a los promotores de los tres homólogos Fur de *Anabaena* PCC7120 (Hernández et al., 2004a). A la luz de estos antecedentes y los datos de este trabajo, era posible plantear la hipótesis de que FurC pudiera estar inhibiendo la unión de FurB a sus promotores específicos de manera global y no como un hecho aislado que solo ocurriría con los promotores fur. Los resultados de ensayos de tipo EMSA donde se incubaron conjuntamente FurC y FurB con los promotores de *sodA* y *alr0998* por separado revelaron que, en efecto, FurC inhibía *in vitro* la unión específica de FurB a estos dos promotores. Además, estos hechos son coherentes con datos de Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) obtenidos en nuestro laboratorio que sugirieron una interacción entre ambos parálogos, probablemente mediante la formación de un heterodímero. Estas observaciones parecían reforzar la hipótesis mencionada de que FurC modula la actividad transcripcional de FurB.

Sin embargo, estudios posteriores deberán definir cuál es el papel concreto que realiza FurC sobre la regulación de FurB. La inhibición de FurB por FurC observada *in vitro* no se correspondería con el comportamiento *in vivo* observado en el cual los patrones de respuesta a estrés oxidativo de los genes *sodA* y *alr0998* se encuentran impedidos en la cepa de sobreexpresión de FurC. Es lógico pensar que las condiciones reproducidas *in vitro* con los ensayos EMSA no coincidan con las condiciones *in vivo*, donde pueden influir otros factores a veces muy difíciles de contemplar en su totalidad en este tipo de ensayos.

En todo caso, es lógico pensar que podría existir una interacción entre FurC y los otros parálogos Fur de *Anabaena* PCC7120. En otros organismos, se ha descrito que PerR es capaz de interaccionar utilizando diversos mecanismos, con los respectivos reguladores encargados de modular la homeostasis de hierro y de zinc para ofrecer una respuesta coordinada al estrés oxidativo (Faulkner and Helmann, 2010). En algunos organismos como *B. subtilis* o *Neisseria gonorrhoeae*, se ha caracterizado que el aumento de Zn^{+2} y el secuestro del Fe^{+2} intracelular ejerce un efecto protector en condiciones de estrés oxidativo. En *B. subtilis*, PerR es capaz de regular a un transportador de zinc (*zosA*) y, en *N. gonorrhoeae*, el regulón de PerR consta de varios genes relacionados respuesta a la falta de zinc (Faulkner and Helmann, 2010). En *Anabaena* PCC 7120 se ha descrito que FurB corresponde al regulador Zur (Napolitano et al., 2012) responsable de la regulación de la homeostasis del zinc. En caso de que la interacción de FurC y FurB tuviera lugar *in vivo*, podría ocurrir que esta fuera responsable de un efecto similar que en última instancia elevaría la concentración de Zn^{+2} intracelular para proteger del daño oxidativo. Además, el hecho de que FurB también ha demostrado tener un papel en el estrés oxidativo (López-Gomollón et al., 2009; Sein-Echaluce et al., 2015) parecen reforzar la hipótesis de que estos dos reguladores pudieran estar contribuyendo de manera coordinada en la defensa frente al mencionado estrés.

En resumen, este trabajo ha conseguido aportar nueva información sobre la función de FurC en el estrés oxidativo como el posible regulador PerR en *Anabaena* PCC7120. Tanto los datos obtenidos gracias a la caracterización fenotípica como por el posterior análisis transcripcional de la cepa de sobreexpresión apuntan a que el aumento de la concentración de FurC genera alteraciones en la respuesta contra el estrés oxidativo. Además, este trabajo ha aportado nueva información sobre un posible mecanismo de interacción de FurC con su parálogo FurB que implicaría una correlación entre el estrés oxidativo y la homeostasis del zinc. A pesar de ello, este estudio no ha sido capaz de describir en detalle cual es el mecanismo de FurC por el cual interviene en la respuesta a estrés oxidativo de *Anabaena* PCC7120. Estudios posteriores deberán caracterizar en detalle el funcionamiento de FurC según su estado de oxidación y la presencia de Mn^{+2} o Fe^{+2} quienes podrían regular su actividad.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo han dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. La sobreexpresión de FurC genera una mayor sensibilidad al estrés oxidativo.
2. La mayor expresión de FurC genera una disminución de la tasa fotosintética neta y un aumento de la tasa respiratoria.
3. Las actividades catalasa y superóxido dismutasa se encuentran disminuidas debido a la sobreexpresión de FurC. Además, la isoforma SodA parece encontrarse ausente en la cepa EB2770.
4. El exceso de FurC altera la expresión del gen *prxA* en condiciones normales y de exposición a agentes oxidantes en la cepa EB2770.
5. FurC regula de manera indirecta la respuesta al estrés oxidativo de los genes *alr0998* y *sodA*.
6. FurC modula *in vitro* la capacidad de FurB de unirse a sus promotores diana *sodA* y *alr0998*.

6. Conclusions

The results gathered in this work have led to the following conclusions:

1. FurC overexpression causes a higher sensitivity to oxidative stress
2. The increase of FurC expression generates a reduction of the net photosynthesis rate and the increment of the respiratory rate.
3. The superoxide dismutase and catalase are reduced due to FurC overexpression. Moreover, SodA isoform appear to be absent in the EB2770 strain.
4. FurC excess modifies the *prxA* gene expression in normal conditions as well as in exposition to oxidative agents in the EB2770 strain.
5. FurC regurlates in an indirect manner the *alr0998* and *sodA* genes response to oxidative stress
6. FurC modulates *in vitro* the abitility of FurB to bind to his target promoters *sodA* and *alr0998*.

7. Bibliografía

1. Banerjee, M. et al. (2013) 'Oxidative stress management in the filamentous, heterocystous, diazotrophic cyanobacterium, *Anabaena* PCC7120', *Photosynthesis Research*, 118(1–2), pp. 59–70.
2. Banerjee, M., Ballal, A. and Apte, S. K. (2012) 'Mn-catalase (Alr0998) protects the photosynthetic, nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* PCC7120 from oxidative stress', *Environmental Microbiology*, 14(11), pp. 2891–2900.
3. Beers, R. F. and Sizer, I. W. (1952) 'A Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase', *Journal of Biological Chemistry*, 195(1), pp. 133–140.
4. Botello-Morte, L. et al. (2013) 'Unraveling the Redox Properties of the Global Regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120: Disulfide Reductase Activity Based on Its CXXC Motifs', *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(9), pp. 1396–1406.
5. Botello-Morte, L. et al. (2015) 'Cysteine Mutational Studies Provide Insight into a Thiol-Based Redox Switch Mechanism of Metal and DNA Binding in FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120', *Antioxidants & Redox Signaling*, 24(4), pp. 173–185.
6. Broset, E. (2012) Rol de FurC en *Anabaena* sp. PCC 7120. Trabajo de Fin de Grado.
7. Chen, L., Keramati, L. and Helmann, J. D. (1995) 'Coordinate regulation of *Bacillus* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), pp. 8190–8194.
8. Cui, H. et al. (2012) 'Genome-wide analysis of putative peroxiredoxin in unicellular and filamentous cyanobacteria', *BMC Evolutionary Biology*, 12, p. 220.
9. Delany, I., Rappuoli, R. and Scarlato, V. (2004) 'Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*', *Molecular Microbiology*, 52(4), pp. 1081–1090.
10. Duarte, V. and Latour, J.-M. (2010) 'PerR vs OhrR: selective peroxide sensing in *Bacillus subtilis*', *Molecular BioSystems*, 6(2), pp. 316–323.
11. Faulkner, M. J. and Helmann, J. D. (2010) 'Peroxide Stress Elicits Adaptive Changes in Bacterial Metal Ion Homeostasis', *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(1), pp. 175–189.
12. Fillat, M. F. (2014) 'The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 546, pp. 41–52.
13. Fuangthong, M. and Helmann, J. D. (2003) 'Recognition of DNA by Three Ferric Uptake Regulator (Fur) Homologs in *Bacillus subtilis*', *Journal of Bacteriology*, 185(21), pp. 6348–6357.
14. González, A. et al. (2010) 'Overexpression of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 Reveals New Targets for This Regulator Involved in Photosynthesis, Iron Uptake and Cellular Morphology', *Plant and Cell Physiology*, 51(11), pp. 1900–1914.
15. González, A. et al. (2011) 'Unravelling the regulatory function of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 through 2-D DIGE proteomic analysis', *Journal of Proteomics*, 74(5), pp. 660–671.
16. Hernández, J. A., Peleato, M. L., et al. (2004) 'Heme binds to and inhibits the DNA-binding activity of the global regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120', *FEBS Letters*, 577(1–2), pp. 35–41.

17. Hernández, J. A., López-Gomollón, S., et al. (2004) 'Three fur homologues from *Anabaena* sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition', *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), pp. 275–282.
18. Imlay, J. A. (2008) 'Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide', *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), pp. 755–776.
19. Ji, C.-J. et al. (2018) 'The roles of two O-donor ligands in the Fe²⁺-binding and H₂O₂-sensing by the Fe²⁺-dependent H₂O₂ sensor PerR', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 501(2), pp. 458–464.
20. Kaushik, M. S. et al. (2017) 'Impairment of *ntcA* gene revealed its role in regulating iron homeostasis, ROS production and cellular phenotype under iron deficiency in cyanobacterium *Anabaena* sp PCC 7120', *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 33(8), p. 158.
21. Lai, L.-S., Chang, P.-C. and Chang, C.-T. (2008) 'Isolation and Characterization of Superoxide Dismutase from Wheat Seedlings', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), pp. 8121–8129.
22. Latifi, A., Ruiz, M. and Zhang, C.-C. (2009) 'Oxidative stress in cyanobacteria', *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), pp. 258–278.
23. Lee, J. W. and Helmann, J. D. (2006) 'The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation', *Nature*, 440(7082), pp. 363–367.
24. Li, H. et al. (2004) 'Differential gene expression in response to hydrogen peroxide and the putative PerR regulon of *Synechocystis* sp strain PCC 6803', *Journal of Bacteriology*, 186(11), pp. 3331–3345.
25. Li, T. et al. (2002) 'Differential expression and localization of Mn and Fe superoxide dismutases in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp strain PCC 7120', *Journal of Bacteriology*, 184(18), pp. 5096–5103.
26. López-Gomollón, S. et al. (2009) 'New insights into the role of Fur proteins: FurB (All2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress', *Biochemical Journal*, 418(1), pp. 201–207.
27. Lucarelli, D. et al. (2007) 'Crystal Structure and Function of the Zinc Uptake Regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*', *Journal of Biological Chemistry*, 282(13), pp. 9914–9922.
28. Massé, E. and Gottesman, S. (2002) 'A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), pp. 4620–4625.
29. Mongkolsuk, S. and Helmann, J. D. (2002) 'Regulation of inducible peroxide stress responses', *Molecular Microbiology*, 45(1), pp. 9–15.
30. Nabout, J. C. et al. (2013) 'How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number', *Biodiversity and Conservation*, 22(12), pp. 2907–2918.
31. Napolitano, M. et al. (2012) 'Characterization of the Response to Zinc Deficiency in the Cyanobacterium *Anabaena* sp Strain PCC 7120', *Journal of Bacteriology*, 194(10), pp. 2426–2436.
32. Pfaffl, M. W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in *real-time* RT-PCR', 29(9), p. e45.
33. Rippka, R. (1988) '[1] Isolation and purification of cyanobacteria', in *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 3–27.
34. Sein-Echaluce, V. C. et al. (2018) 'Molecular basis for the integration of environmental signals by FurB from *Anabaena* sp. PCC 7120', *Biochemical Journal*, 475(1), pp. 151–168.
35. Sein-Echaluce, V. C. et al. (2015) 'Zur (FurB) is a key factor in the control of the oxidative stress response in *Anabaena* sp. PCC 7120', *Environmental Microbiology*, 17(6), pp. 2006–2017.
36. Sengupta, A., Pakrasi, H. B. and Wangikar, P. P. (2018) 'Recent advances in synthetic biology of cyanobacteria', *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 1–15.
37. Sevilla, E. et al. (2011) 'Identification of three novel antisense RNAs in the *fur* locus from unicellular cyanobacteria', *Microbiology*, 157(12), pp. 3398–3404.
38. Traoré, D. A. K. et al. (2009) 'Structural and functional characterization of 2-oxo-histidine in oxidized PerR protein', *Nature Chemical Biology*, 5(1), pp. 53–59.
39. Winterbourn, C. et al. (1975) The estimation of red cell {SOD} activity.
40. Yingping, F. et al. (2014) 'Unravelling the cross-talk between iron starvation and oxidative stress responses highlights the key role of PerR (alr0957) in peroxide signalling in the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120', *Environmental Microbiology Reports*, 6(5), pp. 468–475.
41. Zheng, M. and Storz, G. (2000) 'Redox sensing by prokaryotic transcription factors', *Biochemical Pharmacology*, 59(1), pp. 1–6.

Material suplementario

Medio basal 1x (3L)		
Reactivo	Masa (g)	Concentración final (μM)
NaNO_3	4,05	16
NaHCO_3	2,14	8,8
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	0,12	0,2
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,108	0,25
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,225	0,3
Na_2CO_3	0,06	0,2

Tabla 1. Composición del medio basal BG11

Suplemento 1000x (100mL)		
Reactivo	Masa (mg)	Concentración final (μM)
Citrato de amonio férrico	600	30
Ácido cítrico	600	30
EDTA	100	190
H_3BO_3	286	46
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	181	9,15
$\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	13,8	0,77
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	39	1,61
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	7,9	0,32
CaCl_2	4,94	0,17

Tabla 2. Composición del suplemento del medio BG11.

Gel 10%	
H_2O	1.7 mL
TrisCL 1,5mM pH 8.8	2.24 mL
Bis/acrilamida 30%	2 mL
PSA 10%	20 μL
TEMED	10 μL

Tabla 3. Composición del gel 10% de poliacrilamida para separar las dos isoformas de la SOD de *Anabaena* PCC7120

Mezcla 1	Volumen (μL)	Mezcla 2	Volumen (μL)
Random primers	1	dNTPs	2
Tampón de hibridación	2	DTT	4
RNA	2 μg	Tampon 5α	8
Agua RNasefree	Completar hasta 20 μl	Agua RNasefree	5
		Retrotranscriptasa	1
Total	20	Total	20

Tabla 4. Composición de las dos mezclas secuenciales para la retrotranscripción

Primer	Secuencia	Uso
<i>rnp B_fw</i>	AGCGGAACTGGTAAAAGACCA	qRT-PCR
<i>rnp B_rev</i>	GAGAGGTACTGGCTCGGTAAAC	qRT-PCR
<i>prxA_fw</i>	CCATCACCTACGGAACACAAGA	qRT-PCR
<i>prxA_rev</i>	TCCTGATCAACTACAGCTGTTGCT	qRT-PCR
<i>sodA_fw</i>	CTAACCAAACCCAACCACTAC-CA	qRT-PCR
<i>sodA_rev</i>	CCTTTGGCAGTTTTGAAGAGTTC	qRT-PCR
<i>alr0998_fw</i>	ACCCACGGGATGTCATTATGA	qRT-PCR
<i>alr0998_rev</i>	TGGCAACGCACCTAAACCA	qRT-PCR
<i>psodA_fw</i>	GAT AGA ATC AAT GAC TGC TC	EMSA
<i>psodA_rev</i>	GTT GTT GCC TCT TAT TTG	EMSA
<i>palr0998_fw</i>	TCA GAT TTC TTT AGC AAT TAG TCT AC	EMSA
<i>palr0998_rev</i>	ACA TTT TGT AGC CCA ATT AGT GAC	EMSA
<i>pprxA_fw</i>	GTCCAGAAGGCGGATTGTC	EMSA
<i>pprxA_rev</i>	CTTAATTCTCCTTCAACTTATATCGG	EMSA

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación específica de qRT-PCR y para amplificación de promotores para ensayos EMSA.

Reactivos	μl por reacción
SYBR® Green	12.5
Primer FW (25μM)	0.2
Primer REV (25μM)	0.2
DEPC-H ₂ O	7.1

Tabla 6. Composición de la mezcla de reacción para la amplificación por qRT-PCR

Gel 6%	Volumen (mL)
H ₂ O	5.79
Acrilamida 30%	2
Tampón de electroforesis x10	0.93
Glicerol 50%	1.4
PSA 10%	50 (ul)
TEMED	30 (ul)

Tabla 7. Composición del gel 6% de poliacrilamida para los ensayos EMSA.

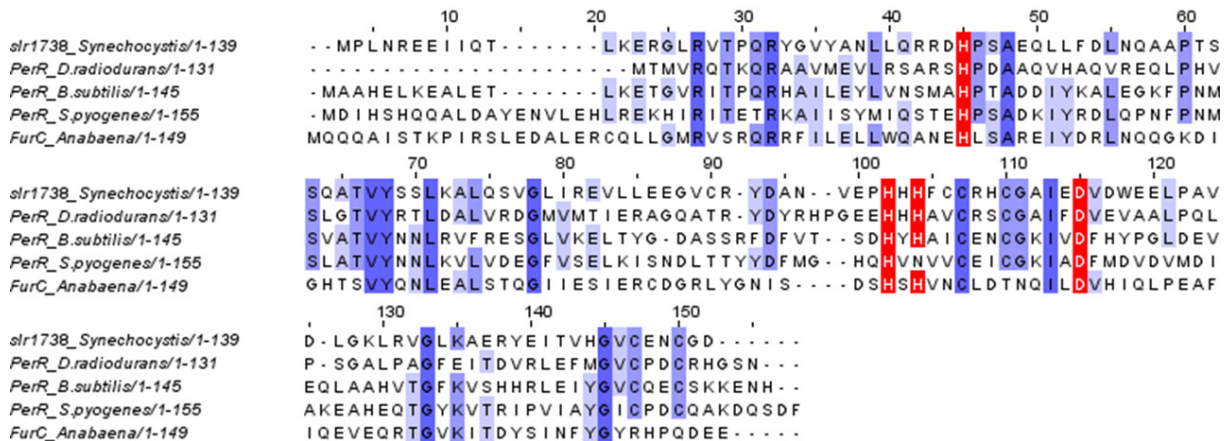


Figura 1. Alineamiento de las secuencias PerR de *Synechocystis* PCC6803 (slr1738), *Deinococcus radiodurans*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus pyogenes* junto con la secuencia de FurC de *Anabaena* PCC7120. En azul se resaltan los residuos conservados con distinta intensidad según su grado de conservación. En rojo se resaltan los residuos conservados que se han descrito relevantes para el mecanismo de acción de PerR de *B. subtilis*.